

**Säureproduktion und Säuretoleranz
oralen Aktinomyzeten**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

Vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Heidi Bauer
geboren am 02.10.1976 in Erfurt

31.10.2003

Gutachter

1. Prof. Dr. Susanne Kneist
2. Prof. Dr. Wolfgang Pfister
3. Prof. Dr. Knut Merte

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.07.2004

Abkürzungsverzeichnis

β -NAG	β -N-Azetyl-Glucosaminidase
Ala	Alanin
CaCl_2	Kalziumchlorid
CFU	Einheit für die Anzahl der Mikroorganismen (colonie forming unit = Kolonie bildende Einheit)
CO_2	Kohlendioxid
dmft	Kariesindex Anzahl der behandelten oder behandlungsbedürftigen Milchzähne mit den Komponenten d = decayed = zerstört, m = missing = fehlend, f = filled = gefüllt, t = teeth = Zähne
DMFT	Kariesindex Anzahl der behandelten oder behandlungsbedürftigen permanenten Zähne mit den Komponenten D = decayed = zerstört, M = missing = fehlend, F = filled = gefüllt, T = teeth = Zähne
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNB	Dextrosenährbouillon
G+C-Gehalt	Guanin-Cytosin-Gehalt in der DNA
H^+/ATPase	Protonen transportierender Zellmembrankanale (Protonen-Adenosintriphosphatase)
HCl	Salzsäure
Jg.	Jahrgang
Lys	Lysin
M	Molarität
N	Normalität
NaCl/TEA	Kochsalzlösung/Triethanolaminhydrochlorid
NaOH	Natriumhydroxid
O_2	Sauerstoff
OD_{650}	optische Dichte bei 650 nm Wellenlänge
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid
pK	Dissoziationskonstante
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung
SM	<i>Streptococcus mutans</i>

TG	Trockengewicht
U/min	Umdrehung pro Minute
WHO	Weltgesundheitsorganisation
\bar{x}	Mittelwert

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung.....	1
2 Einleitung.....	3
2.1 Zur spezifischen und unspezifischen Plaquehypothese.....	3
2.2 Aktinomyzeten im Wandel der Zeit – Ein Überblick.....	6
2.3 Merkmale der Aktinomyzeten.....	11
2.4 Die Mundhöhle als Lebensraum der Aktinomyzeten.....	15
3 Zielstellung.....	19
4 Klinisch-experimentelles Vorgehen.....	20
4.1 Reaktivierung der Bakterienstämme.....	20
4.2 Vorkulturen und Hauptkulturen.....	21
4.3 Bestimmung der Säureproduktion.....	23
4.4 Bestimmung der Säuretoleranz.....	25
4.5 Statistische Methoden.....	25
5 Ergebnisse.....	26
5.1 Wachstumskinetische Parameter.....	26
5.1.1 Voruntersuchungen.....	26
5.1.2 Extinktionen und pH-Werte der Bakteriensuspensionen der Aktinomyzeten in den unterschiedlichen Wachstumsphasen.....	27
5.1.2.1 Extinktionen.....	27
5.1.2.2 pH-Werte.....	30
5.2 Säureproduktion und Säuretoleranz.....	33
5.2.1 Säureproduktionen der Aktinomyzeten bei unterschiedlichen pH-Werten in den drei verschiedenen Wachstumsphasen.....	33
5.2.1.1 Säureproduktion bei pH 8,0.....	33
5.2.1.2 Säureproduktion bei pH 7,0.....	38
5.2.1.3 Säureproduktion bei pH 6,0.....	42
5.2.1.4 Säureproduktion bei pH 5,0.....	46
5.2.2 Synopse zur Säureproduktion und Säuretoleranz der Aktinomyzeten.....	50
6 Diskussion.....	53
7 Schlußfolgerung.....	68
8 Literaturverzeichnis	69
9 Anhang.....	80

1 Zusammenfassung

Ziel vorliegender Studie war die Bestimmung der maximalen Säureproduktion und Säuretoleranz von oralen Aktinomyzeten.

Für die In-vitro-Untersuchungen konnte auf Stämme zurückgegriffen werden, die während einer longitudinalen Kariesrisikostudie aus Plaque und Speichel von 60 Kindern und Jugendlichen gewonnen wurden (Stöber, 1998). Mutans-Streptokokken (Bergholz, 2002) und Laktobazillen (Baake, 2003) aus der Grundgesamtheit der Stammsammlung wurden bereits untersucht, so daß sich der Stammvergleich mit Aktinomyzeten anbot, die mit etwa 60% in der Keimzahl der Plaque bzw. zu etwa 20% in der Keimzahl des Speichels der Kinder und Jugendlichen vertreten waren. Es sollten maximal 5 Stämme von *A. naeslundii*, dem dominanten Artvertreter der Plaque, und maximal je 5 cremefarbene und rot pigmentierte Stämme von *A. odontolyticus*, dem dominanten Artvertreter des Speichels, untersucht werden.

Die Säureproduktion der 13 repräsentativ ausgewählten Stämme wurde mit gewaschenen Zellsuspensionen vor, während und nach dem Ende der logarithmischen Wachstumsphase bei einem konstanten pH-Wert von pH 7,0 mit der Titrationsanlage (Titra LabTM, Radiometer Analytical A/S – Kopenhagen) bestimmt. Weiterhin wurde die Säureproduktion der Stämme bei den pH-Werten pH 8,0, pH 6,0 und pH 5,0 untersucht, um ihre Säuretoleranz zu erfassen.

Die Wachstumskinetik sowie die Säureproduktionen der verschiedenen pigmentierten Stämme von *A. odontolyticus* erwiesen sich als gleich ($p > 0,05$, Mann-Whitney-U-Test). Die maximale Säureproduktion bei pH 7,0 lag in der späten logarithmischen Wachstumsphase vor. Die cremefarbenen Stämme ($n = 3$) bildeten im Mittel $245 \text{ nmol [H}^+ \text{]min}^{-1}$ und die rot pigmentierten Stämme ($n = 5$) $229 \text{ nmol [H}^+ \text{]min}^{-1}$. Auch bei pH 8,0 und in den sauren pH-Bereichen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den cremefarbenen (pH 8,0: $156 \text{ nmol [H}^+ \text{]min}^{-1}$, pH 6,0: $122 \text{ nmol [H}^+ \text{]min}^{-1}$, pH 5,0: $53 \text{ nmol [H}^+ \text{]min}^{-1}$) und rot pigmentierten Stämmen (pH 8,0: $191 \text{ nmol [H}^+ \text{]min}^{-1}$, pH 6,0: $137 \text{ nmol [H}^+ \text{]min}^{-1}$, pH 5,0: $43 \text{ nmol [H}^+ \text{]min}^{-1}$) aufgezeigt werden.

Insgesamt produzierte *A. odontolyticus* mit $237 \text{ nmol [H}^+ \text{]min}^{-1}$ bei pH 7,0 im Vergleich zu *A. naeslundii* ($n = 5$) mit $318 \text{ nmol [H}^+ \text{]min}^{-1}$ signifikant weniger Säure und ebenso bei pH 8,0 ($173 \text{ nmol [H}^+ \text{]min}^{-1}$ und $256 \text{ nmol [H}^+ \text{]min}^{-1}$). Bei pH 6,0 und pH 5,0 lagen in der Säureproduktion keine signifikanten Unterschiede mehr vor (pH 6,0: $135 \text{ nmol [H}^+ \text{]min}^{-1}$ und $147 \text{ nmol [H}^+ \text{]min}^{-1}$, pH 5,0: $48 \text{ nmol [H}^+ \text{]min}^{-1}$ und $36 \text{ nmol [H}^+ \text{]min}^{-1}$).

Zusammengefaßt verhielt sich einerseits *A. naeslundii* als stärker azidogen als *A. odontolyticus*, der andererseits *A. naeslundii* in seinen azidurischen Eigenschaften überlegen war.

Beim Vergleich der Säureproduktion von Mutans-Streptokokken, Laktobazillen und Aktinomyzeten aus der gleichen Grundgesamtheit aller Stämme lag die der Mutans-Streptokokken und Laktobazillen in allen pH-Bereichen deutlich höher als die der Aktinomyzeten. Die höchste Säuretoleranz zeigten die Laktobazillen. Die Stämme von *A. odontolyticus* erreichten bei pH 6,0 und pH 5,0 Aktivitäten, die denen einiger Streptokokken gleich kamen. Die niedrigste Säuretoleranz zeigten die Stämme von *A. naeslundii*.

Wurde die in vitro bestimmte Säureproduktion der kariogenen Arten auf ihre Prävalenz in Plaque und Speichel der Kinder und Jugendlichen zu Studienbeginn übertragen, konnte hypothetisch ihr „relativer“ Anteil an der Gesamtsäuremenge der Plaque bzw. des Speichels zur Diskussion gestellt werden.

Aufgrund ihrer hohen Prävalenz bildeten die Aktinomyzeten, besonders *A. naeslundii*, in der Plaque mindestens gleich hohe Säuremengen wie die Mutans-Streptokokken. Mit sinkendem pH-Wert nahm der Säureanteil der Aktinomyzeten ab und der der Mutans-Streptokokken gegenläufig zu. *A. odontolyticus* spielt als Standortkeim des Speichels nur eine unbedeutende Rolle in der Plaque. Im Speichel lag aufgrund der Höhe ihres Vorkommens der Säureanteil der Mutans-Streptokokken über dem von *A. naeslundii*. Im Gegensatz zur Plaque gewann *A. odontolyticus* im Speichel bei sinkendem pH-Wert an Bedeutung. Sein Anteil am Säuregehalt des Speichels lag wegen seines deutlich höheren Vorkommens höher als in der Plaque. Laktobazillen, die selektiv angezüchtet wurden, spielten im komplexen Keimspektrum auf Hirn-Herz-Blutagar keine Rolle und wurden deshalb in der hypothetischen Hochrechnung nicht berücksichtigt.

Aktinomyzeten dürften in der Mundhöhle an verschiedenen Standorten unterschiedlich stark zur Säuremenge beitragen und dies auch in niedrigen pH-Bereichen, wenngleich sie nicht nur die stärkste organische Säure, die Milchsäure, produzieren. Da Aktinomyzeten die Masse der Plaque ausmachen, frühe Besiedler sind, durch ihre Adhäsine zur Anlagerung weiterer Keime beitragen und dabei gleichzeitig durch ihre Säureproduktion die Etablierung azidogener und azidurischer Keime - beispielsweise Mutans-Streptokokken - fördern, läßt sich unschwer die Bedeutung der Mundhygiene für die Kariesprävention erkennen.

2 Einleitung

2.1 Zur spezifischen und unspezifischen Plaquehypothese

Der lateinische Begriff „Caries“ bedeutet Fraß oder Morschheit und schließt neben der Demineralisation der Zahnhartgewebe das klinische Erscheinungsbild der kariösen Zerstörung von Zahnschmelz, Dentin und Zement ein. Nach anthropologischen Funden ist die Karies so alt wie die Menschheit; die ältesten Funde von Menschen mit Kariesbefall stammen aus dem Tertiär vor etwa 40 Millionen Jahren. Noch heute ist die Karies weit verbreitet; in den siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts stand sie immer noch an 6. Stelle der WHO-Liste von Erkrankungen, die es auszurotten galt (Künzel, 1997). Auch wenn seit den 80iger Jahren des letzten Jahrhunderts besonders in den Industrienationen der Welt ein Kariesrückgang („caries decline“) registriert werden konnte, ist Karies unter sozioökonomischen Aspekten betrachtet immer noch ein großes Problem. Der Kariesrückgang wird besonders auf die Verfügbarkeit der Fluoride zurückgeführt, deren kariespräventive Wirkung durch Dean (1933, 1934, 1936, 1938), Dean und Elvove (1936) und Dean et al. (1941, 1942) erkannt worden war. Durch den Einsatz der Fluoride war erstmals eine symptomatische Behandlung der Karies im Sinne der Steuerung von De- und Remineralisation zugunsten der Remineralisation der Zahnhartgewebe möglich geworden, obwohl das Ursachengefüge der Karies weiterhin noch viele Fragen offen ließ.

So prägte bereits 1886 der amerikanische Zahnarzt G.V. Black (1836 –1915) den Begriff „Plaque“ und sah in den „...gelatineartigen mikrobiellen Zahnbelägen“ die Ursache der Karies, eine Tatsache, die letztlich aber erst Mitte des letzten Jahrhunderts im Sinne der KOCHschen Postulate bewiesen werden konnte. Miller (1853 - 1907) hatte in seinem Werk „Die Mikroorganismen der Mundhöhle“ (Miller, 1889) *Leptothrix innominata*, *Bacillus buccalis maximus*, *Jodococcus vaginatus*, *Spirillus sputigenum* und *Spirochaeta dentium* aus kariösem Dentin beschrieben (Abb. 1); heute werden über 500 verschiedene Bakterien bzw. Mikroorganismen in der Mundhöhle angenommen (Blech, 2000). Mit der Isolation und Beschreibung von *Streptococcus mutans* aus kariösem Dentin durch Clarke (1924) entfachte der wissenschaftliche Meinungsstreit, welchem Keim Bedeutung für die Kariesauslösung beigemessen werden sollte; Streptokokken- und Laktobazillen-Anhänger standen sich gegenüber. Erst mit den gnotobiotischen Versuchen um Orland ging Mitte der 50er Jahre des letzten Jahrhunderts

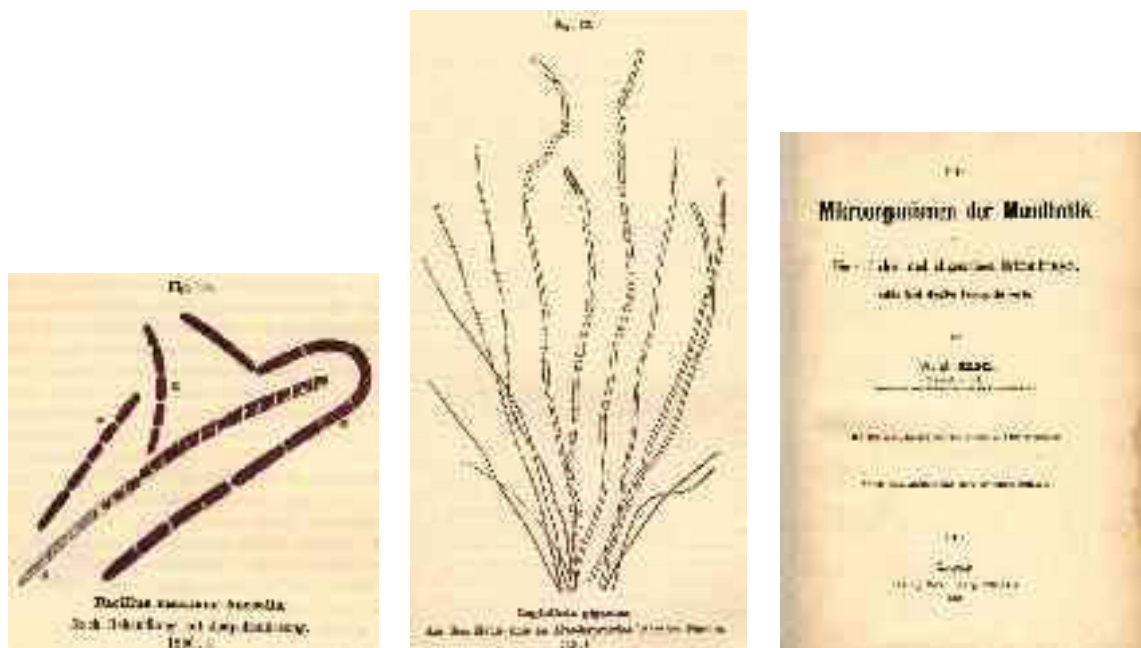


Abbildung 1: Zeichnungen von *Bacillus buccalis maximus* (links) und *Leptothrix innominata* (Mitte) im Buch „Die Mikroorganismen der Mundhöhle“ von Miller (1889) (rechts)

die Laktobazillenära zu Ende und *Streptococcus mutans* erlebte eine Renaissance (Orland et al., 1954, 1955). Orland et al. (1954, 1955) hatten bei keimfrei gezüchteten Ratten nach Infektion mit Streptokokken und bei Gabe zuckerhaltiger Diät Karies ausgelöst; infizierte Tiere mit zuckerfreier Diät entwickelten dagegen keine Karies (Abb. 2).



Abbildung 2: Wurzelkariesmodellversuch an der Ratte. Isolator zur gnotobiotischen Haltung der Tiere (links). Rattenkiefer mit Wurzelkaries nach Infektion der Tiere mit *A. viscosus* OMZ 105 (rechts) (Stöber et al., 1989a; Kneist et al., 1990)

Während sich Miller (1889) kritisch mit den Kariestheorien seiner Zeit auseinandersetzte (in den Zähnen angehäuften schlechte Säfte, Ernährungsstörungen, Entzündung, Würmer, Fäulnis, chemische Zerstörung, Parasiten, elektrolytische Zersetzung des Zahngewebes und diverse andere Ursachen) und selbst die chemisch-parasitäre Kariestheorie entwickelte, konnten erst Keyes et al. (1962) durch die gnotobiotischen Kariesmodellversuche und nachfolgenden konventionellen Tierversuche die heute gültige Kariestheorie begründen. Danach ist Karies multifaktoriell bedingt; das Zusammenspiel von Zähnen (Wirt), Mikroorganismen und vergärbaren Substraten führt zur Kariesauslösung. König (1971) fügte den Faktor Zeit hinzu. Mit den Plaquehypothesen, der spezifischen und unspezifischen, wurde nun der mikrobiellen Komponente der Karies nachgegangen. Die spezifische Plaquehypothese setzt eine ökologische Verschiebung zugunsten azidogener und azidurischer Keime an der Zahnfläche voraus, die mit weiteren Virulenzeigenschaften die Kariesauslösung begünstigen. Die nicht-spezifische Plaquehypothese sieht im Zusammenwirken aller den Zahn kolonisierenden Mikroorganismen und ihren verschiedensten physiologischen Stoffwechselprodukten die Ursache der Kariesauslösung und Progression.

Mutans-Streptokokken, den humanpathogenen Arten *S. mutans* und *S. sobrinus*, wird nach der spezifischen Plaquehypothese besondere Bedeutung für die Auslösung und Progression der Karies beigemessen. Mutans-Streptokokken können an Zahnglattflächen adhärieren, besitzen Glycosyltransferasen, produzieren extra- und intrazelluläre Polysaccharide sowie Milchsäure, die stärkste organische Säure (pK 3,86), sind selbst säuretolerant und behaupten sich in der komplexen Plaqueflora durch ihre antibakterielle Bakteriozinproduktion. Mit diesen Virulenzfaktoren etablieren sie sich nach dem Zahndurchbruch erfolgreich in der Mundhöhle und tragen mit ihrer Milchsäureproduktion zur Demineralisation der Zahnhartgewebe bei. Laktobazillen zählen zur Standortflora des Speichels und können nicht an Zahnglattflächen haften. Ökologische Nischen der Laktobazillen sind kariöse Läsionen und Randspalten von Zahnfüllungen, in denen sie durch ihre Milchsäureproduktion zur Progression der Karies bzw. Sekundärkaries beitragen (Loesche, 1986).

Die Reinkulturtechnik, das Verdienst von Robert Koch, und die nach ihm benannten Postulate (Tab. 1) könnten über ein halbes Jahrhundert dazu beigetragen haben, die mikrobiellen Wechselwirkungen, wie sie in natürlichen Populationen vorliegen, in ihrer Bedeutung zu unterschätzen. Da Plaque ein Biofilm ist, können die den Zahn

kolonisierenden Keime im Sinne der unspezifischen Plaquetheorie den Zahn schützen oder auch zur Demineralisation beitragen.

Tabelle 1: Die Koch-Henle Postulate

-
1. Der Keim muß bei einer Krankheit regelmäßig beim Patienten (oder beim Tier) nachweisbar sein.
 2. Er muß sich regelmäßig in Reinkultur isolieren lassen.
 3. Der isolierte Keim muß beim Versuchstier die gleiche Krankheit hervorrufen können.
-

Aktinomyzeten dominieren im Zahnbelag (Kneist et al., 1998). Mit ihrer Säureproduktion aus den Kohlenhydraten der Nahrung können auch sie zur pH-Abnahme in der Plaque beitragen. Für die Auslösung der Wurzelkaries bei Erwachsenen jenseits des 35. Lebensjahres wird ihnen Bedeutung beigemessen (Seichter, 1987).

2.2 Aktinomyzeten im Wandel der Zeit – Ein Überblick

Die Entdeckung der Aktinomyzeten geht zurück auf das Jahr 1877. Der deutsche Tierarzt Bollinger fand in den bis dahin als Sarkom angesehenen Geschwülsten im Kiefer von betroffenen Rindern „Kristallblöcke“, die eine fädige, pilzähnliche Struktur aufwiesen; er bezeichnete diese „Kristallblöcke“ als "Drusen" (im englischen "vuggs" oder auch "sulfur granules"). Der Botaniker Harz (1877) bestätigte die Mikrobennatur der „Drusen“ und benannte sie wegen ihrer strahlenförmigen Konfiguration im mikroskopischen Bild generell als Strahlenpilze und im speziellen Fall als *Actinomyces bovis*. Die Erkrankung der Tiere wurde nach dem Erreger als Aktinomykose bezeichnet. Kurze Zeit später beschrieb der Berliner Chirurg Israel (1878) die Krankheit auch beim Menschen. Allerdings konnten die pathogenen Arten erst 10 Jahre später erfolgreich isoliert und kultiviert werden (Bujwid, 1889). Wolff und Israel (1891) konnten nun eine bessere Artbeschreibung vornehmen, und Lachner-Sandoval schlug 1898 für die von Israel entdeckte Art das Taxon *A. israelii* vor.

Breed und Conn (1919) empfahlen dann als Gattungsnamen *Actinomyces* für die Gruppe der „Strahlenpilze“ mit *A. bovis* als Untergruppe. Das Winslow-Committee bestätigte 1920 die Gattung *Actinomyces* (Winslow et al., 1920); damit wurde die von Meyen (1827) zuvor benutzte Beschreibung *Actinomyces* für einen Pilz ungültig. Letzterer

wurde in *Tremella meteorica* umbenannt.

Durch verbesserte mikrobiologische Methoden und taxonomische Unterscheidungskriterien wurden nun weitere Arten der Gattung *Actinomyces* beschrieben. Thompson und Lovestedt (1951) schlugen den Namen *A. naeslundii* für eine von Carl Naeslund 1925 aus der menschlichen Mundhöhle isolierte neue Art vor.

Physiologische und biochemische Eigenschaften wurden nun verstärkt zur Identifizierung der Arten herangezogen. Pine und Georg (1969a, 1969b) nutzten zur Artbeschreibung die Zell- und Koloniemorphologie, den Zellwandaufbau, Stoffwechselendprodukte und physiologische Eigenschaften. Georg et al. (1969a, 1969b) nahmen in die Gattung auch die katalasepositiven Arten auf. So wurde *A. viscosus* reklassifiziert und aus der Gattung *Odontomyces* (Howell et al., 1965) ausgegliedert. Gleichzeitig wurde *Actinomyces propionicus* aus der Gattung *Actinomyces* ausgeschlossen und zunächst als *Arachnia propionica* und später als *Propionibacterium propionicum* neu beschrieben. Die Umklassifizierung war gerechtfertigt, weil *P. propionicum* als Stoffwechselendprodukt hauptsächlich Propionsäure bildet und die Zellwand Diaminopimelinsäure enthält (Pine und Georg, 1969a, 1969b).

Grampositive, überwiegend stäbchenförmige Bakterien in T-, V- und X-Form, die von Batty (1958) erstmalig aus tiefen fortgeschrittenen kariösen Läsionen beim Menschen isoliert und beschrieben wurden, konnten als *A. odontolyticus* in die Gattung aufgenommen werden.

Chemotaxonomische und DNA-Technologien hielten Einzug in die Mikrobiologie und ermöglichten weitere Neubeschreibungen unter den Aktinomyzeten. Reddy et al. (1982) und Collins und Jones (1982) reklassifizierten *Corynebacterium pyogenes* als *A. pyogenes*. Dent und Williams (1984a, 1984b, 1984c, 1986) beschrieben mit *A. denticolens*, *A. howellii* und *A. slackii* drei neue Arten aus dem Zahnbelag von Milchkühen. Phänotypisch ähnelten die letzteren drei Arten zwar *A. naeslundii* bzw. *A. viscosus*, aber sie unterschieden sich von diesen in einigen physiologischen Reaktionen und durch die Zellwand- und DNA-Basenzusammensetzung. Buchanan et al. (1984) beschrieben bei erkrankten Hunden *A. hordeovulneris* als weitere neue Art.

Von Cato et al. (1984) wurde *A. meyeri* in die Gattung *Actinomyces* aufgenommen. *A. meyeri* wurde zuerst von Kurt Meyer (1911) beschrieben und von Prevot (1938) der Gattung "*Actinobacterium*" zugeordnet.

Untersuchungen zur DNA-DNA-Homologie und Untersuchungen mit DNA-Gen-Sonden haben gezeigt, daß die Art *A. israelii* heterogen ist und in mindestens zwei unabhängige Arten getrennt werden muß (Schofield und Schaal, 1981; Stackebrandt und Charfreitag, 1990). Johnson et al. (1990) konnten mit Hilfe der S1-Nuklease-Technik zeigen, daß es sich bei den beiden Serotypen von *A. israelii* um zwei unabhängige und eigenständige Taxa handelt. Für den Serotyp II wurde die Bezeichnung *Actinomyces gerencseriae* vorgeschlagen. *A. gerencseriae* wurde aus dem Gingivalspalt von parodontal gesunden Personen isoliert. Gleichzeitig beschrieben Johnson et al. (1990) auch *A. georgiae* als menschlichen Kommensalen im gesunden Parodontium.

Lange Zeit war trotz zeitgemäßer taxonomischer Untersuchungstechniken unklar, ob *A. naeslundii* und *A. viscosus* unterschiedliche Arten sind, oder ob sie eine einzige Art repräsentieren. Auch hier schlugen Johnson et al. (1990) eine neue Klassifizierung vor. *A. naeslundii* Genospezies 1 entspricht danach dem bisherigen Serotyp I von *A. naeslundii*, während Genospezies 2 die vormaligen Serotypen II und III repräsentiert sowie den Serotyp II von *A. viscosus*; die Bezeichnung *A. viscosus* bleibt zukünftig Isolaten von Tieren vorbehalten. In der vorliegenden Arbeit wird jedoch die alte Nomenklatur beibehalten, da die zitierten Autoren in ihren Publikationen vor 1990 bei der Auswahl ihrer Stämme zwischen *A. naeslundii* und *A. viscosus* unterschieden.

Aus der Mundhöhle wurden in den letzten Jahren zwei weitere neue Arten von Aktinomyzeten gewonnen. Zum einen wurde *A. graevenitzii* aus Sekret des Respirationstraktes und aus dem Speichel von Kindern isoliert (Ramos et al., 1997; Sarkonen et al., 2001) und zum anderen wurde *A. radidentis* aus therapieresistenten infizierten Wurzelkanälen beschrieben (Collins et al., 2000; Kalfas et al., 2001).

Weitere Aktinomyzeten wurden in der Vergangenheit auch von Abszessen und aus Blut (*A. neuii*, *A. funkei*, *A. europaeus*), bei polymikrobiellen Infektionen (*A. radingae* und *A. turicensis*) und aus dem Genitaltrakt (*A. urogenitalis*) gewonnen.

In die verwandten Gattungen *Arcanobacterium* und *Actinobaculum* wurden *Actinobaculum schalii*, *Actinobaculum suis* (früher *Actinomyces suis*), *Arcanobacterium bernardiae* und *Arcanobacterium pyogenes* (früher *Actinomyces bernardiae* und *Actinomyces pyogenes*) reklassifiziert (Funke et al., 1994, 1997; Wüst et al., 1995; Lawson et al., 1997, 2001; Ramos et al., 1997; Nikolaitchouk et al., 2000).

Die Art *A. humiferus* wurde gültig von Gledhill und Casida (1969) veröffentlicht, obwohl sich der Standort von *A. humiferus* deutlich von denen der zuvor beschriebenen

Aktinomyzeten unterscheidet. *A. humiferus* wurde ausschließlich aus Erde isoliert, die reich an organischen Substanzen ist; in den Bodenproben dominierte *A. humiferus* zahlenmäßig (Gledhill und Casida, 1969). Aus den genannten Gründen wird die Zugehörigkeit von *A. humiferus* zur Gattung *Actinomyces* angezweifelt und bedarf weiterer Untersuchungen.

In Tabelle 2 sind die bislang als Aktinomyzeten beschriebenen Arten menschlichen Ursprungs zusammenfassend dargestellt, während Abbildung 3 die phylogenetische Position der Aktinomyzeten darstellt.

Tabelle 2: Bisherige taxonomische Änderungen der humanen Aktinomyzeten und verwandten Gattungen

Jahr	Gültige Nomenklatur	Bisherige Nomenklatur oder taxonomische Position	Quelle
1898	<i>Actinomyces israelii</i>	Neubeschreibung	Mundhöhle
1951	<i>Actinomyces naeslundii</i> *	Neubeschreibung	Mundhöhle
1958	<i>Actinomyces odontolyticus</i>	Neubeschreibung	Mundhöhle
1969	<i>Actinomyces viscosus</i> *	<i>Odontomyces</i>	Mundhöhle
1984	<i>Actinomyces meyeri</i>	<i>Actinobacterium</i>	Gingivaspalt
1990	<i>Actinomyces gerencseriae</i>	<i>A. israelii</i> Serotyp II	Gingivaspalt
1990	<i>Actinomyces georgiae</i>	Neubeschreibung	Gingivaspalt
1990	<i>Actinomyces naeslundii</i> *	<i>A. viscosus</i> und <i>A. naeslundii</i>	
1994	<i>Actinomyces neuui</i> subsp. <i>anitratus</i>	CDC Gruppe 1 coryneform	Abszess, Blut
1994	<i>Actinomyces neuui</i> subsp. <i>neuui</i>	CDC Gruppe 1 coryneform	Abszess, Blut
1995	<i>Actinomyces radingae</i>	<i>A. pyogenes</i> -ähnlich (APL1)	Polymikrobielle Infektion
1995	<i>Actinomyces turicensis</i>	<i>A. pyogenes</i> -ähnlich (APL10)	Polymikrobielle Infektion
1995	<i>Actinomyces europaeus</i>	Neubeschreibung	Abszess
1997	<i>Actinomyces graevenitzi</i>	Neubeschreibung	Respirationstrakt
2000	<i>Actinomyces radicidentis</i>	Neubeschreibung	Mundhöhle
2000	<i>Actinomyces urogenitalis</i>	Neubeschreibung	Urogenitaltrakt
2001	<i>Actinomyces funkei</i>	Neubeschreibung	Blut
1997	<i>Actinobaculum schalii</i>	Neubeschreibung	Blut
1997	<i>Arcanobacterium bernardiae</i>	<i>Actinomyces bernardiae</i>	Abszess, Blut
1997	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	<i>Actinomyces pyogenes</i>	Polymikrobielle Infektion

* Zusammenfassung von *A. naeslundii* und *A. viscosus* in eine Art (1990): Genospezies 1 enthält den bisherigen Serotyp I von *A. naeslundii*, Genospezies 2 enthält die Serotypen II und III von *A. naeslundii* sowie den Serotyp II von *A. viscosus*

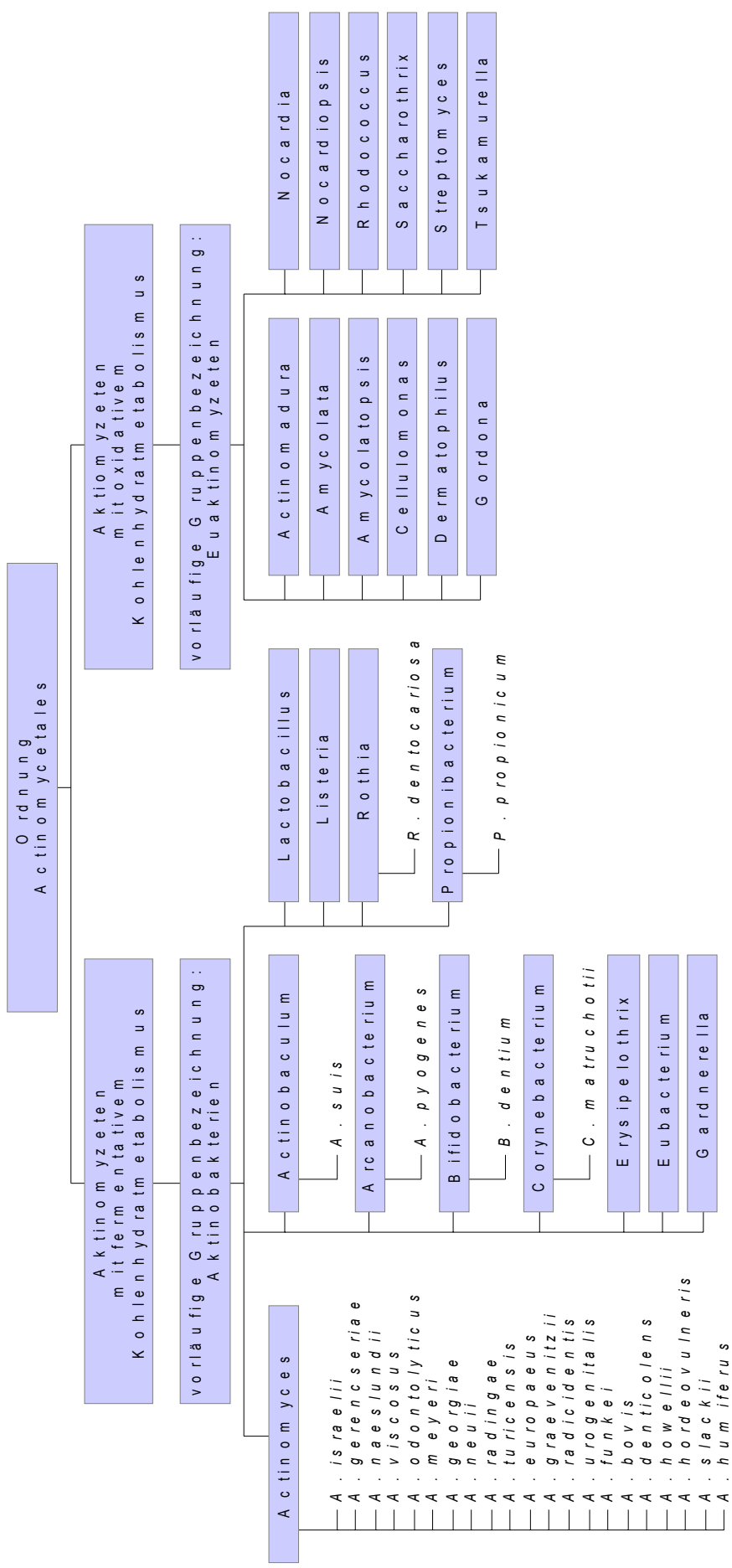


Abbildung 3: Die phylogenetische Position der Aktinomyzeten

2.3 Merkmale der Aktinomyzeten

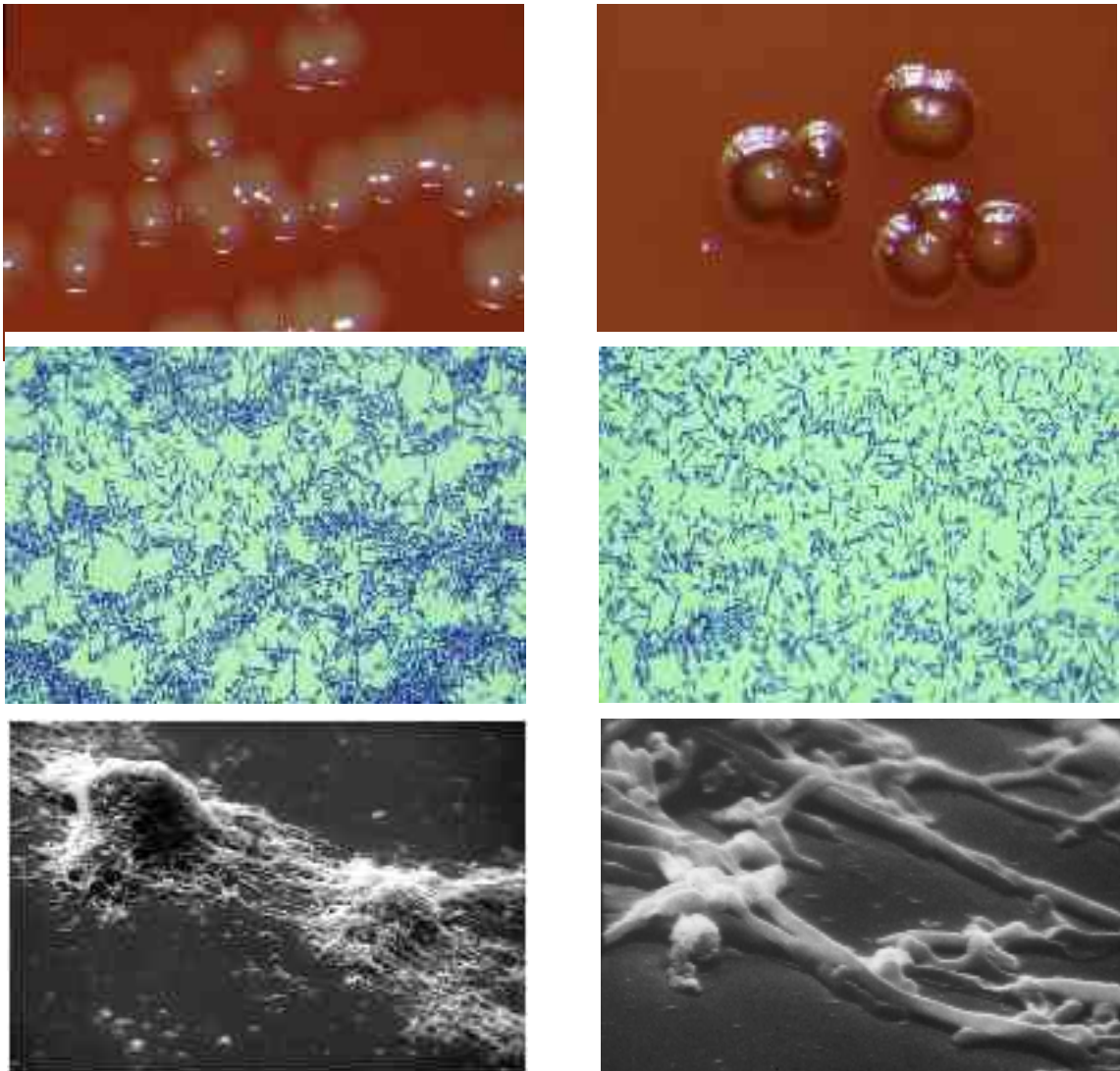
Die fakultativ bis obligat anaeroben, grampositiven, sporenlosen Stäbchenbakterien stellen eine ausgesprochen heterogene Gruppe von Mikroorganismen dar. Ein Großteil zählt heute zur Gruppe der Aktinobakterien. Es handelt sich dabei um Aktinomyzeten mit deutlich rudimentärem oder fehlendem Substratmyzel. Soweit vorhanden, zerfällt das Myzel in stäbchenförmige, gelegentlich auch kokkoide Fragmentationsformen. Lufthyphen sowie Konidien oder andere typische Dispersionssporen werden in der Regel nicht gebildet. Die meisten bedeutsamen Aktinobakterien gehören primär zur physiologischen Schleimhautflora warmblütiger Wirtsorganismen, können aber auch endogene Entzündungsprozesse verursachen.

In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Schaal, 1986) werden die Aktinomyzeten (Abb. 4) mit geraden oder leicht gebogenen Stäbchen beschrieben, die im Durchmesser 0,2-1,0 μm breit sind und deutlich in Form und Größe variieren können. Die Filamente sind schlank, bis 1 μm breit und 10-50 μm oder mehr lang; echte Verzweigungen liegen vor. Die kurzen Stäbchen erscheinen einzeln, gepaart (in diphteroidaler Anordnung als T-, V- oder Y-Formen oder in Pallisaden) bzw. in kurzen Ketten oder Mikrokolonien. Längere verzweigte Stäbchen liegen genauso häufig vor. Die Filamente sind entweder gerade oder gewellt, verschieden verzweigt und können verdickte Enden aufweisen. Die Bakterien zeigen in der Gramfärbung häufig ein perlschnurartiges oder gestreiftes Bild, sind aber eindeutig grampositiv. Sie sind nicht säurefest, unbeweglich und bilden keine Endosporen. Die Aktinomyzeten bevorzugen ein anaerobes Milieu und benötigen für ein optimales Wachstum CO_2 (kapnophile fakultative Anaerobier), wobei zwischen den einzelnen Arten beträchtliche Schwankungen bestehen. Die Optimaltemperatur für ihr Wachstum liegt bei 35-37°C; *A. meyeri* wächst auch bei 30°C gut.

Die einzelnen Arten produzieren charakteristische filamentöse Mikrokolonien aus verzweigten, septierten oder nicht septierten Filamenten mit oder ohne Zeichen zentraler Fragmentation. Andere Arten bilden dagegen überwiegend oder ausschließlich nicht-filamentöse Mikrokolonien, die hauptsächlich aus diphteroidalen und/oder verzweigten Stäbchen bestehen.

Reife Kolonien (7-14 Tage) sind 0,5-5,0 mm groß und in ihrer Struktur rauh mit myzelialem Rand, trocken bis bröckelig oder glatt, weich bis mukös. Aufgrund der vielen morphologischen Zwischenstufen ist eine makroskopische Unterscheidung der

Abbildung 4: Cremefarbene und rot pigmentierte Kolonien von Aktinomyzeten auf Hirn-Herz-



Blutagar (oben), Aktinomyzeten im mikroskopischen Bild nach Kultivierung in Dextrose-Nähr-Bouillon und Gramfärbung (Mitte), Aktinomyzeten im rasterelektronenmikroskopischen Bild (unten)

Arten nur bedingt möglich. Die meisten Stämme sind weiß bis cremefarben. Eine Ausnahme stellt *A. odontolyticus* dar; auf Blutagar kann *A. odontolyticus* cremefarbene oder dunkelrote Kolonien bilden (Batty, 1958). Nach Sarkonen et al. (2001) sind nach 5-tägiger Bebrütung auf Hasenblutagar Kolonien von *A. odontolyticus* immer braun bis purpurrot und Kolonien von *A. graevenitzii* immer dunkel bis schwarz pigmentiert. *A. radidentis* imponiert mit braunen und *A. urogenitalis* mit rötlichen Kolonien auf Hasenblutagar.

Aktinomyzeten sind chemo-organotroph und haben gewöhnlich einen fermentativen Metabolismus. Kohlenhydrate werden überwiegend zu Säuren abgebaut. Die Endprodukte der Glukosefermentation sind Ameisensäure, Essigsäure, Milchsäure und

Bernsteinsäure; Propionsäure wird nicht gebildet.

Zum Wachstum benötigen sie organisch gebundenen Stickstoff. Sie sind katalasenegativ oder katalasepositiv und produzieren kein Indol.

Im Peptidoglykan ihrer Zellwände enthalten Aktinomyzeten die Aminosäuren Lysin und entweder Asparaginsäure oder Ornithin oder keine der beiden letztgenannten. Diaminopimelinsäure und Glyzin sind nicht vorhanden. Die Zellwand kann Glukose, Galaktose, Rhamnose, 6-Deoxytalose, Fukose oder Mannose enthalten aber keine Arabinose oder Xylose. Der G+C-Gehalt der DNA umfaßt 57-69 mol%.

Zur Identifizierung der Aktinomyzeten stellten Sarkonen et al. (2001) morphologische und biochemische Schlüsselreaktionen vor (Abb. 5). Die rote Pigmentation von Arten war erst nach Überprüfung der Katalasereaktion bzw. β -N-Azetyl-Glukosaminidase ein ausreichendes Bestimmungskriterium. Kaetzke et al. (2003) konnten ergänzend dazu aufzeigen, daß es sich bei rot pigmentierte Aktinomyzeten aus Plaque- und Speichelproben auf Hirn-Herz-Blutagar immer um *A. odontolyticus* (Abb. 4) handelt.

		Katalase		Pigment	
1 _____ 0					
pigmentierte kokkoide Zellen					
1 _____ 0		1 _____ 0		1 _____ 0	
<i>A. radidentis</i>	cAMP	β - NAG	Urease		
1 _____ 0		1 _____ 0	1 _____ 0		
<i>A. neuII</i> <i>A. viscosus</i>	Äskulin <i>A. odontolyticus</i>	Äskulin, aerob	l-Arabinose		
Nitrat	1 _____ 1	1 _____ 0	1 _____ 0		
1 _____ 0	<i>A. urogenitalis</i> Kolonien adhären	<i>A. naeslundii</i> <i>A. meyeri</i>	α - Fucosidase	Äskulin	
<i>ss. neuII</i> <i>ss. anitratus</i>	<i>A. graevenitzii</i>	1 _____ 0	1 _____ 0	1 _____ 0	
		<i>A. funkei</i> <i>A. israelii</i>	β - NAG	β - NAG, ONPG	
		<i>A. radingae</i> <i>A. georgiae</i> <i>A. meyeri</i> <i>A. turicensis</i>	1 _____ 0	1 _____ 0	
		<i>A. europaeus</i>			
		<i>A. gerencseriae</i>			

0 = negative Reaktion

1 = positive Reaktion

β - NAG = β -N-Azetyl-Glukosaminidase

ONPG = o-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid

cAMP = zyklisches Adenosin-mono-Phosphat

ss. = subspecies

Abbildung 5: Schlüsselreaktion zur Identifikation der Aktinomyzeten

2.4 Die Mundhöhle als Lebensraum der Aktinomyzeten

Der primäre Lebensraum der humanen Aktinomyzeten ist die Mundhöhle und dort besonders der Zahnbelag. Ätiopathologisch sind sie bedeutsam für die Auslösung einer Gingivitis und Parodontitis und für die Auslösung der Wurzelkaries jenseits des 35. Lebensjahres (Socransky, 1970; Socransky und Manganiello, 1971; Schaal, 1986; Seichter, 1987).

Bollinger (1877) und Israel (1877) beschrieben die Aktinomyzeten bereits vor mehr als 100 Jahren als obligate Krankheitserreger der Aktinomykose. Bergey (1907) beschrieb filamentöse Bakterien, die an den Zähnen hafteten und an der Formierung der dentalen Plaque beteiligt waren. Zahlreiche Publikationen bestätigten das Vorkommen von filamentösen Bakterien in der Mundhöhle, wobei das Spektrum von pathogenen bis hin zu nicht pathogenen Arten reichte, die den größten Anteil der oralen Mikroflora bildeten.

Die ersten Hinweise auf ein generelles Vorkommen pathogener Aktinomyzeten in der Mundhöhle gesunder Menschen gehen auf Lord (1910) zurück. Aktinomyzeten sind – wie wir heute wissen – fakultative bzw. opportunistische Krankheitserreger, die normalerweise nicht übertragen werden und nur unter bestimmten Bedingungen in das Gewebe eindringen (Lentze, 1938a, 1938b, 1969; Slack und Gerencser, 1975; Pulverer und Schaal, 1978, 1984a, 1984b; Schaal, 1979, 1986; Schaal und Beaman, 1984; Schaal und Pulverer, 1984). Aktinomyzeten unterscheiden sich von anderen Opportunisten darin, daß sie keine immungeschwächten Wirte für ihre Invasion benötigen sondern nur passende lokale Startbedingungen.

So gilt *A. israelii* als fakultativ pathogener, primär als Kommensale lebender, residenter Keim der oralen Mikroflora des Menschen. Den gleichen Status nehmen *A. naeslundii*, *A. viscosus* und *A. odontolyticus* ein, die regelmäßig in der Mundhöhle von gesunden und an Parodontitis und Wurzelkaries erkrankten Erwachsenen nachgewiesen wurden (Batty, 1958; Socransky, 1970; Slack et al., 1971; Collins et al., 1973; Hill et al., 1977). Der hauptsächliche natürliche Lebensraum von *A. meyeri* scheint der menschliche parodontale Sulkus zu sein (Cato et al., 1984). Ebenso gehören *A. georgiae* und *A. gerencseriae* zur physiologischen Parodontalflora. Eine ätiologische Beteiligung an Gingivitis, Parodontitis oder zervikofazialen Eiterungsprozessen konnte bisher nicht belegt werden (Johnson et al., 1990). Aus subgingivalen Plaqueproben von Parodontitis-Patienten, die erfolgreich behandelt worden waren und ihren Zustand beibehielten,

wurden hohe Keimzahlen grampositiver Bakterien, einschließlich *A. viscosus* und *A. odontolyticus*, nachgewiesen (Asikainen et al., 1987). Bei Patienten mit aktiver Parodontitis dominierten dagegen Spirochäten, Porphyromonaden oder *Bacteroides*, so daß Aktinomyzeten unter diesen Bedingungen nach Loesche et al. (1985) eher als Kommensalen denn als Krankheitserreger betrachtet werden können.

Die bekannteste Krankheit, die durch fermentative Aktinomyzeten verursacht wird, ist die Aktinomykose. Sie ist eine subakute bis chronische, granulomatös entzündliche Krankheit der Weichgewebe des Mundes, die während ihres Verlaufs zu Eiterungen, Abszeßbildung und Durchbruch in die Kieferhöhlen neigt (Slack und Gerencser, 1975; Pulverer und Schaal, 1978, 1984a, 1984b; Schaal, 1979; Schaal und Beaman, 1984). Zu Beginn ähnelt die aktinomykotische Läsion einer langsam fortschreitenden Infiltration, einem akuten Abszeß oder einer Phlegmone. Fortgeschrittene Prozesse neigen dazu, ungeachtet der natürlichen Organränder in Organe zu invadieren (Lentze, 1969, 1970) und zeigen eine Tendenz zur Remission und Exazerbation von Symptomen mit und ohne antibiotischer Therapie (Lentze, 1969; Slack und Gerencser, 1975; Schaal, 1979; Bennhoff, 1984; Schaal und Beaman, 1984).

In ungefähr 45% der subakuten und chronischen Fälle (Pulverer und Schaal, 1978, 1984a, 1984b; Schaal, 1979, 1981; Schaal und Beaman, 1984) enthält der eitrige Durchbruch von aktinomykotischen Prozessen makroskopisch sichtbare (bis 1 Millimeter im Durchmesser), gelbliche bis rötliche oder bräunliche Partikel. Diese Partikel stellen ein Konglomerat der filamentösen Mikrokolonien dar, die sich in vivo bildeten, und die von Reaktionsgewebe – besonders von vielkernigen Granulozyten – umgeben wurden. Bei kleinen Vergrößerungen haben die Gebilde ein blumenkohlähnliches Aussehen. Bei höheren Vergrößerungen ist eine Anhäufung von verwobenen, verzweigten Filamenten mit strahlenförmig angeordneten peripheren Hyphen erkennbar (Lentze, 1969; Slack und Gerencser, 1975; Schaal, 1979, 1981, 1984).

Die Quelle der typischen menschlichen Aktinomykose ist fast immer endogen. Die Verursacher entstammen der Standortflora der Schleimhaut des Patienten selbst. Die Krankheit entwickelt sich daher hauptsächlich im Gewebe nahe den Schleimhautoberflächen, die die Aktinomyzeten beherbergen. Klinisch sind diese Prädispositionsstellen meistens zervikofazial gelegen. Zervikofaziale Aktinomykosen entwickeln sich überwiegend im Weichgewebe um den Unterkiefer. Sie können aber auch das maxilläre Weichgewebe betreffen und sich auf die Orbita, die Nasennebenhöhlen, die Ohren oder

den Nacken ausdehnen (Pape et al., 1984; Olson et al., 1989).

Wegen ihres endogenen Ursprungs sind menschliche Aktinomykosen weltweit verbreitet. Eine Aktinomykose kann während der gesamten Lebenszeit erworben werden (Slack und Gerencser, 1975; Pulverer und Schaal, 1978, 1984a, 1984b).

Aktinomykotische Infektionen des Zentralnervensystems sind selten und können sich entweder hämatogen von den entfernten Stellen (Lungen, Abdomen, Becken) oder durch direkte Ausbreitung von den angrenzenden Foki wie den Ohren, Nasennebenhöhlen oder zervikofazialen Läsionen entwickeln (Smego, 1987).

Thorakale Aktinomykosen haben normalerweise einen Verlauf, der mit einer zervikofazialen Läsion beginnt, die entlang des zervikalen Weichgewebes zum Mediastinum absteigt oder sich durch Aspiration aber auch hämatogen entwickelt. Die Diagnose ist meistens schwierig zu stellen.

Fast alle typischen menschlichen aktinomykotischen Läsionen erscheinen als polymikrobielle Infektionen, in denen der pathogene Aktinomyzet als Leitorganismus dient (Lentze, 1969, 1970), der für das typische klinische Bild und den Verlauf der Krankheit verantwortlich ist. Als Leitkeim wird überwiegend *A. israelii* oder *A. gerencseriae* ggf. auch zusammen mit anderen humanpathogenen Arten gefunden. Die Begleitkeime, die sich in ihrer Prävalenz und Komplexität verändern, verstärken offensichtlich die verhältnismäßig niedrige invasive Energie der Aktinomyzeten durch Erniedrigung des Sauerstoffgehaltes im Gewebe oder durch toxische, nekrotisierende oder andere aggressive extrazelluläre Stoffe (Holm, 1950; Lentze, 1969, 1970; Pulverer und Schaal, 1978, 1984a, 1984b; Schaal, 1979, 1981, 1985a). Die gemischte Aktinomykoseflora besteht entweder aus fakultativen bis strengen Anaerobiern zusammen mit aerob wachsenden Mikroorganismen oder nur aus Anaerobiern (Lentze, 1969; Pulverer, 1974; Pulverer und Schaal, 1978, 1984a, 1984b; Schaal, 1979, 1988a). Ein häufig gefundener Begleitkeim ist *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, bei dessen Anwesenheit die Erkrankung einen besonders chronischen und ernsten Verlauf nimmt.

Die Tränengangsentzündung (Canaliculitis lacrimalis) ist eine andere weniger starke, akute oder subakut rezidivierende nichtinvasive Infektion, die durch fermentative Aktinomyzeten verursacht werden kann. Auch hier werden häufig Konkreme gebildet. Die Verursacher sind in erster Linie *Propionibacterium propionicum*, *A. israelii* und *A. gerencseriae* aber auch *A. naeslundii*, *A. viscosus* und *A.*

odontolyticus (Pine und Hardin, 1959; Pine et al., 1960; Buchanan und Pine, 1962; Slack und Gerencser, 1975; Schaal und Pulverer, 1984; Schaal, 1988b). Oft liegen gleichzeitig zwei verschiedene Arten vor und selten Mischinfektionen mit anderen Bakterien.

Andere entzündliche Prozesse des Auges wie Bindehautentzündung, Dakryozystitis, Keratitis, Gerstenkorn und Granuloma oder sogar intraokulare Infektionen können neben *Propionibacterium propionicum* auch von Aktinomyzeten, besonders *A. israelii*, verursacht werden (Schaal, 1988b).

Bei den häufigsten Erkrankungen der Mundhöhle, der Karies und Parodontitis, sind die Aktinomyzeten auch von besonderer ätiopathogenetischer Bedeutung. So sind besonders *A. viscosus*, *A. naeslundii* und *A. odontolyticus* an der Entwicklung von Karies, Gingivitiden und Parodontitiden beteiligt (Winford und Haberman, 1966; Socransky, 1970; Jordan und Hammond, 1972; Jordan und Sumney, 1973). Filamentöse Bakterien tragen zum Volumen der Plaque deutlich bei und bieten eine enorme zusätzliche Oberfläche für das Attachment anderer Bakterien (Boyd und Williams, 1971; Boue et al., 1987; Fure et al., 1987). Durch ihre Stoffwechselleistungen, der Säureproduktion aus Kohlenhydraten der Nahrung, können sie darüber hinaus zur pH-Senkung in der Plaque und in der unversorgten Kavität beitragen.

Zum besseren Verständnis der Stoffwechselaktivität der Aktinomyzeten in der Mundhöhle sollte sich die vorliegende Studie der Säureproduktion und Säuretoleranz ausgewählter Aktinomyzeten in vitro widmen.

3 Zielstellung

In einer longitudinalen Kariesrisikostudie wurde eine repräsentative Sammlung von Mutans-Streptokokken, Laktobazillen und Aktinomyzeten angelegt (Stöber, 1998; Kneist et al., 1998, Stöber et al., 2000). Mutans-Streptokokken und Laktobazillen wurden bereits hinsichtlich ihrer Virulenzfaktoren Säureproduktion, Säuretoleranz und Bakteriozinogenität in vitro untersucht (Kneist et al., 1999; Bergholz, 2002; Baake, 2003; Scharff, 2003). Dabei konnte gezeigt werden, daß Mutans-Streptokokken und Laktobazillen zwar eine gleich hohe Azidogenität aufweisen, Laktobazillen aber deutlich säuretoleranter sind als Mutans-Streptokokken. Die Bakteriozinogenität der Laktobazillen scheint ihrem Standort angepaßt und richtet sich vornehmlich gegen Speichelkeime (*S. salivarius*). Die Bakteriozinogenität der Mutans-Streptokokken scheint ebenso die Sicherung des Standortes zu unterstützen, denn es wurden hauptsächlich die die Zahnflächen kolonisierenden Nicht-Mutans-Streptokokken in ihrem Wachstum unterdrückt (Scharff, 2003).

Das Anliegen der vorliegenden Untersuchung war es, den Virulenzeigenschaften der Aktinomyzeten nachzugehen. Als Hypothese wurde angenommen, daß Aktinomyzeten im Vergleich zu Mutans-Streptokokken und Laktobazillen deutlich weniger Säure produzieren dürften, diese Tatsache aber mit ihrem zahlenmäßig hohen Vorkommen in der Plaque kompensieren und damit auch zur Absenkung des Plaque-pH-Wertes beitragen können. Stämme von *A. naeslundii* und *A. odontolyticus* sollten in die In-vitro-Untersuchung einbezogen werden; von letzteren wurden cremefarbene und rot pigmentierte Stämme ausgewählt. Die Bestimmung der Säureproduktion und Säuretoleranz sollte von maximal fünf Stämmen pro Gruppe in Anlehnung an die von Birkhed (1978) beschriebene pH-state-Meßtechnik durchgeführt werden.

Die eigenen Ergebnisse sollten dann vergleichend mit den schon vorliegenden Daten der Mutans-Streptokokken und Laktobazillen diskutiert werden. Dazu sollten auch die Prävalenzen der Keimgruppen in Plaque und Speichel der Studienteilnehmer, von denen die Stämme gewonnen wurden, berücksichtigt werden, um die Bedeutung der Aktinomyzeten weiter zu beleuchten.

4 Klinisch-experimentelles Vorgehen

4.1 Reaktivierung der Bakterienstämme

Unter aseptischen Bedingungen wurden aus Microbanks™ (Abb. 6), in denen die Stämme konserviert waren, mit Hilfe einer sterilen Impfnadel 3 – 4 Keramikperlen mit dem jeweiligen Stamm entnommen und in ein Kulturröhrchen mit Bouillon nach Balmelli oder Trypticase–Soja–Bouillon überführt. Unter anaeroben Bedingungen (GasPak, BBL) wurde das mit einem ausgewählten Stamm beimpfte Kulturröhrchen 24 bis 48 Stunden bei 37°C bebrütet. Der reaktivierte Stamm wurde auf seine Reinheit überprüft und als Vorkultur passagiert. In Tabelle 3 sind die für die Untersuchung ausgewählten Bakterienstämme aufgelistet.

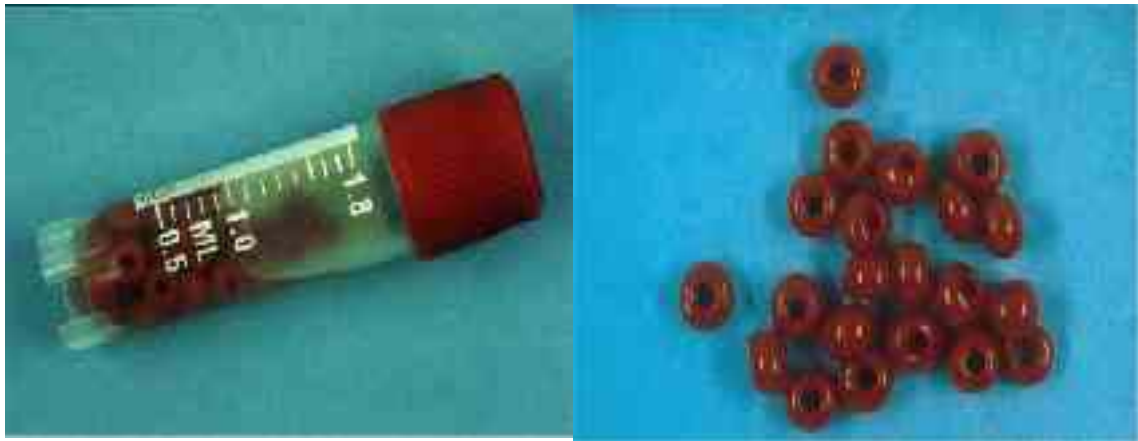


Tabelle 3: Für die In-vitro-Untersuchungen ausgewählte Aktinomyzeten

Taxon	Stammnummern	Σ
<i>A. naeslundii</i>	R3/35, R24/661, R29/794, R38/1034, W54/981	5
<i>A. odontolyticus</i> rot pigmentiert	R22/580, R48/1355, W8/112, W17/216, W26/386	5
<i>A. odontolyticus</i> cremefarben	R4/59, R6/88, W55/1007	3

4.2 Vorkulturen und Hauptkulturen

Die Vorkulturen wurden auf Schrägagar nach Balmelli (Abb. 7) verimpft und im Vakuumbrutschrank (VT 5042 EK, Heraeus) bei 37°C unter anaeroben Bedingungen (95% Stickstoff, 5% Kohlendioxid) bebrütet. Nach 24 Stunden wurde der Bakterienrasen der Schrägagarkulturen mit etwa 5 ml Dextrosenährbouillon abgeschwemmt (DNB, Merck KGaA) (Abb. 7) und in einen sterilen Glashomogenisator überführt. Die gewonnene Suspension wurde auf eine optische Dichte (OD_{650}) von 1,00 eingestellt (650 nm, 1 cm Küvette, Spectronic® Genesys™ 5, Spectronic Instruments Inc., Rochester, USA). Um den zu untersuchenden Stamm nach 16- bis 18stündiger Bebrütung am Ende seines logarithmischen Wachstums bearbeiten zu können, wurden je nach dem Wachstumsverhalten Verdünnungen zwischen der Originalsuspension und 10^{-3} gewählt.



Abbildung 7: Schrägagarröhrchen im Brutschrank (links), Abschwemmen des Bakterienrasens von einer Epprouvette (rechts)

Mit jeweils 1 ml der entsprechend homogenisierten und verdünnten Bakterien-suspension wurden 3 bis 6 Kulturansätze mit je 200 ml DNB in Fernbachkolben beimpft und anschließend zwischen 14 und 23 Stunden bei 37°C anaerob bebrütet (Abb. 8). Die Messungen wurden zwei Stunden vor, während und zwei Stunden nach dem Ende des logarithmischen Wachstums vorgenommen. Die Bearbeitung wurde mit der Bestimmung von pH-Wert und Extinktion der Bakteriensuspensionen (OD_{650} , 1 cm Küvette, Spectronic® Genesys™ 5, Spectronic Instruments Inc., Rochester, USA) pro Kulturintervall begonnen. Der jeweilige Kulturansatz wurde in Zentrifugenbecher überführt (Abb. 8) und 5 Minuten bei 5000 U/min und 4°C zentrifugiert (Biofuge 22 R, Heraeus).



Abbildung 8: Fernbachkolben im Brutschrank (links), Bakterienkultur in der Zentrifuge (rechts)

Der Überstand wurde dekantiert und das gewonnene Sediment (Abb. 9) dreimal in physiologischer Kochsalzlösung/Triethanolaminhydrochlorid (NaCl/TEA; 0,002 M TEA in 0,9%iger NaCl, pH 7,0 eingestellt mit 1M NaOH [Merck KGaA]) gewaschen, zentrifugiert und resuspendiert.

Das gewaschene Bakteriensediment wurde in einem Glashomogenisator durch Zugabe von NaCl/TEA im Eisbad homogenisiert (Abb. 9) und solange verdünnt, bis es eine OD₆₅₀ von 1,10 aufwies. Aus Gründen der späteren Vergleichbarkeit der Ergebnisse der Aktinomyzeten mit denen der Streptokokken und Laktobazillen (Kneist et al., 1999; Bergholz, 2002; Baake, 2003) wurde die Transmission von 1,10 gewählt; als Leerwert diente NaCl/TEA.

Die so standardisierte Bakteriensuspension wurde für die In-vitro-Untersuchungen zur Säureproduktion und Säuretoleranz der Aktinomyzetenstämme eingesetzt.

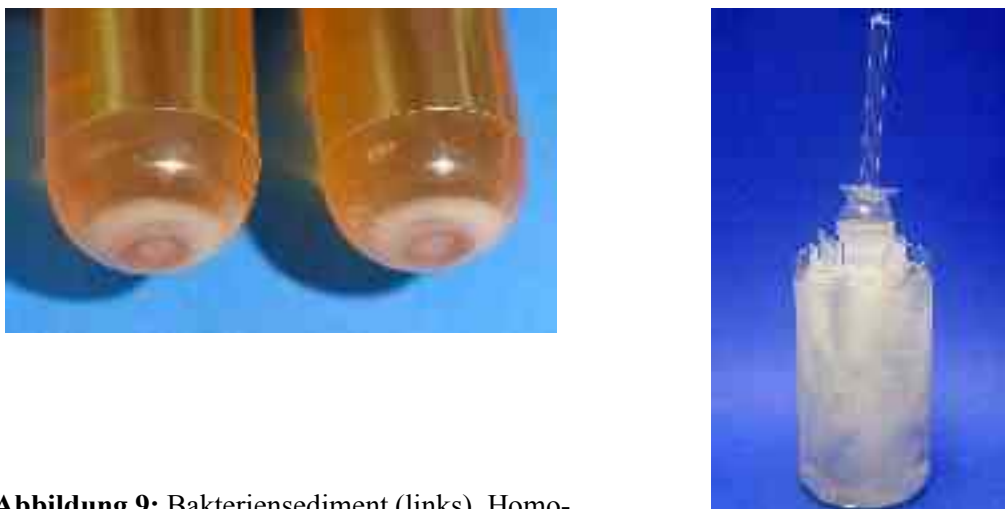


Abbildung 9: Bakteriensediment (links), Homogenisator im Eisbad (rechts)

4.3 Bestimmung der Säureproduktion

Die Bestimmung der Säureproduktion der Bakterien erfolgt mit der Titrationsanlage Titra Lab™ (Radiometer Analytical A/S – Copenhagen, Abb. 10). Bei dem Verfahren wird durch Titration der pH-Wert der Bakteriensuspension konstant gehalten. Infolge der Glukoseverstoffwechselung produzieren die Bakterien Säure, die durch Zugabe von einer entsprechenden Menge Lauge neutralisiert wird. Dabei wird der Laugenverbrauch der gebildeten Menge Säure gleichgesetzt. Die Bestimmung der Säureproduktion der Bakteriensuspension wurde in Anlehnung an die von Birkhed (1978) beschriebene pH-state-Meßtechnik durchgeführt.



Abbildung 10: Titrationsanlage Titra Lab™

Die zur Titration verwendete 0,005 M NaOH (Merck KGaA) wird durch die Titrationsanlage automatisch in Abhängigkeit vom gemessenen pH-Wert in das Reaktionsgefäß über eine Zugabespritze eingebracht. Für eine ständige Durchmischung der Bakteriensuspension während des Versuches sorgt ein Magnetrührer der Probenstation (SAM 90); die Temperaturkonstanz von 37°C wird durch ein an das Reaktionsgefäß angeschlossenes Wasserbad (SUE 3DT Hetotherm, Heto Lab Equipment A/S, Allerød, Dänemark) gewährleistet. Eine Glaselektrode (pH-Einstabmeßkette N5800A, Schott-Geräte) zur Bestimmung des pH-Wertes im Reaktionsgefäß (Abb. 11) und ein ThinkJet-Drucker (Hewlett-Packard), mit dem die Analyseergebnisse aufgezeichnet wurden, ergänzen das System.

Für den Versuchsansatz wurden jeweils 5 ml der homogenisierten Bakteriensuspension in das Reaktionsgefäß pipettiert. Nach einer Erwärmungsphase von ca. 1 min betrug die Temperatur der Suspension 37°C und der Ausgangs-pH-Wert lag bei pH 7,0.

Durch Substratzugabe von 100 µl 0,5 M Glukose wurde die Säureproduktion gestartet. Die Säureproduktion wurde bei konstantem pH-Wert von pH 7,0 über einen Zeitraum

von 6 Minuten erfaßt und für die ersten 4 Minuten als Mittelwert in $\text{nmol}[\text{H}^+]\text{min}^{-1}$ angegeben (Abb. 11).

Mit 14 bis 23 Stunden alten Kulturen sollte in zweistündigen Wachstumsintervallen der wachstumskinetische Punkt herausgefunden werden, in dem die Stämme ihre maximale Säureproduktion erreichen; gewöhnlich liegt dieser Punkt am Ende der logarithmischen Wachstumsphase. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen vorgenommen.

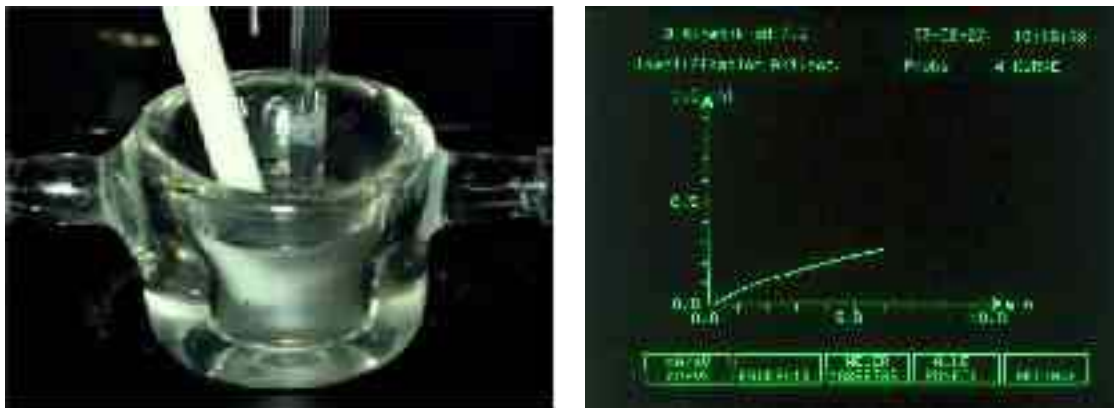


Abbildung 11: Reaktionsgefäß mit Magnetrührer (links), Monitorbild des Titra Lab™ bei aktiver Messung eines Stammes bei pH 7,0 (rechts)

Neben der Extinktion und dem pH-Wert wurde am Ende der logarithmischen Wachstumsphase von den für die Messungen standardisiert eingestellten Bakterienkulturen auch das Trockengewicht bestimmt.

Zur Trockengewichtsbestimmung wurden 5 ml der Bakteriensuspension, die auf eine OD_{650} von 1,10 eingestellt worden waren, in einem vorgewogenen Reagiergefäß (Eppendorf) bei 4000 U/min 5 Minuten (Megafuge 1.0, Heraeus) zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Sediment wurde im offenen Reagiergefäß 24 Stunden in einem Exsikkator über CaCl_2 getrocknet. Die Gefäße wurden gewogen und anschließend bei 70°C 24 Stunden im Trockenschrank (memmert Modell 200, Schwabach) gelagert, im Exsikkator abgekühlt und bis zur Gewichtskonstanz des Sediments gewogen. Im Mittel war bis zum Erreichen der Gewichtskonstanz des Bakteriensediments ein viermaliges Trocknen und Wägen erforderlich. Für alle Stämme wurden im Wachstumsoptimum Fünffachbestimmungen vorgenommen.

4.4 Bestimmung der Säuretoleranz

Die Bestimmung der Säuretoleranz der Bakterienstämme erfolgte auch mit der Titrationsanlage Titra Lab™. Die Kulturen wurden ebenfalls wie die Messungen bei pH 7,0 zwei Stunden vor, während und zwei Stunden nach dem Ende der logarithmischen Wachstumsphase durchgeführt. Untersucht wurde die Säureproduktion bei pH 8,0 sowie die Säuretoleranz bei pH 6,0 und pH 5,0.

Nachdem 5 ml Bakteriensuspension in das Reaktionsgefäß pipettiert worden war, wurde der vorgegebene pH-Wert manuell mit Hilfe von 0,01 N bzw. 0,1 N HCl bzw. NaOH eingestellt. Gleichzeitig erreichte die Suspension eine Temperatur von 37°C. Durch Zugabe der Glukoselösung wurde die Säureproduktion gestartet, während der Titrierautomat den vorgewählten pH-Wert konstant hielt.

Die bei den verschiedenen pH-Werten registrierte Aktivität wurde mindestens dreifach bestimmt, zur Säureproduktion bei pH 7,0 in Relation gesetzt und prozentual berechnet.

4.5 Statistische Methoden

Aus den Dreifachbestimmungen wurden die Mittelwerte, Mediane und Standardabweichungen der Säureproduktionen bei jedem pH ermittelt. Die Säuretoleranz wurde prozentual zum Maximalwert bei pH 7,0 (= 100%) ausgedrückt.

Mit dem Friedman-Test wurden die einzelnen Parameter (pH-Werte, Extinktionen und Säureproduktionen) zwischen den aufeinanderfolgenden Wachstumsphasen auf signifikante Unterschiede überprüft. Der Mann-Whitney-U-Test diente dem Vergleich jeweils eines Parameters in zwei Gruppen (z.B. zwischen *A. odontolyticus* cremefarben und rot pigmentiert). Die Signifikanz wurde auf $p \leq 0,05$ festgelegt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS.

5 Ergebnisse

5.1 Wachstumskinetische Parameter

5.1.1 Voruntersuchungen

Um einen zeitlichen Anhaltspunkt für das Ende der logarithmischen Wachstumsphase der Aktinomyzeten zu bekommen, wurde zunächst der cremefarbene Stamm *A. odontolyticus* R4/59 hinsichtlich seiner Wachstumskinetik untersucht.

Zur Herstellung des Inokulums wurde eine 24-Stunden-Schrägagar-Kultur verwendet, die mit steriler Dextrose-Nähr-Bouillon abgeschwemmt und auf eine optischen Dichte von OD_{650} 1,00 eingestellt wurde. 1 ml der 1:10 verdünnten Bakteriensuspension diente als Inokulum für 200 ml Dextrose-Nähr-Bouillon in Fernbachkolben. Die Kultivierung erfolgte im Vakuumbrutschrank (VT 5042 EK, Heraeus) bei 37°C unter anaeroben Bedingungen (95% Stickstoff und 5% Kohlendioxid). Im zweistündigen Rhythmus zwischen 6 und 24stündiger Kultivierung wurden der pH-Wert und die Extinktion der Bouillon gemessen sowie die koloniebildenden Einheiten (CFU) von *A. odontolyticus* R4/59 und das Trockengewicht pro Milliliter Bouillon bestimmt.

Mit zunehmender Kulturzeit sank der pH-Wert in der Bouillon und die Extinktion nahm zu. Gleichzeitig wurde auch eine Zunahme der CFU und des Trockengewichtes registriert (Abb. 12).

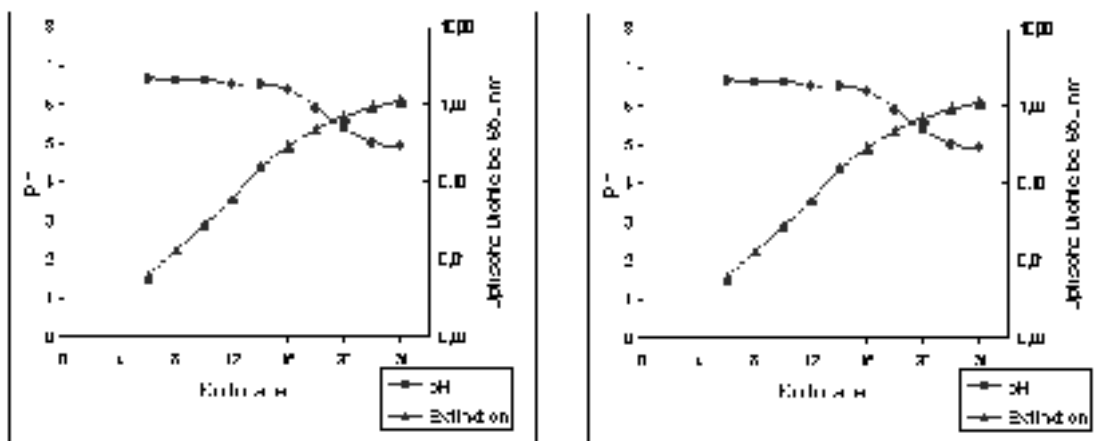


Abbildung 12: pH-Wert und Extinktion (OD_{650} nm, 1 cm) im Kulturmedium in Abhängigkeit vom Kulturalter (in Stunden) des Stammes *A. odontolyticus* R4/59 (links) und Trockengewicht und koloniebildende Einheiten (CFU = colony forming units) des Stammes *A. odontolyticus* R4/59 in Abhängigkeit vom Kulturalter (rechts)

Nach 16- bis 18-stündiger Kultivierung erreichte *A. odontolyticus* R4/59 das Ende der logarithmischen Wachstumsphase, die langsam in die stationäre Phase überging.

Für die nachfolgenden Untersuchungen standen Stämme von *A. naeslundii* – als Artvertreter der Plaque – und Stämme von *A. odontolyticus* – als Artvertreter des Speichels – zur Verfügung. Da zwei Drittel aus der Grundgesamtheit der Stämme von *A. odontolyticus* mit rot pigmentierten Kolonien auf Hirn-Herz-Blut-Agar imponierten, sollten maximal fünf rot pigmentierte und fünf cremefarbene Stämme untersucht werden, um zu prüfen, ob sie sich in ihrer Säureproduktion bzw. –toleranz unterscheiden.

5.1.2 Extinktionen und pH-Werte der Bakteriensuspensionen der Aktinomyzeten in den unterschiedlichen Wachstumsphasen

5.1.2.1 Extinktionen

Wie schon bei der wachstumskinetischen Untersuchung des Stammes *A. odontolyticus* R4/59 nahmen mit zunehmender Kulturzeit die Extinktionen in der logarithmischen Wachstumsphase bis zum Ende der logarithmischen Wachstumsphase und bis zur frühen stationären Phase zu. Die Meßwerte zwei Stunden vor, während und zwei Stunden nach dem Ende der logarithmischen Wachstumsphase werden hier dargestellt.

In der *logarithmischen Wachstumsphase* erreichten die cremefarbenen Stämme von *A. odontolyticus* eine optische Dichte bei einer Wellenlänge von 650 nm zwischen OD₆₅₀ von 0,061 und 0,139. Die Extinktionen der rot pigmentierten Stämme von *A. odontolyticus* lagen bei einer OD₆₅₀ von 0,074 bis 0,149. Die Werte von *A. naeslundii* lagen deutlich darunter; sie erreichten Extinktionen von 0,056 bis 0,112 (Anhang Tab. 1).

Die Extinktionen am *Ende der logarithmischen Wachstumsphase* lagen höher als in der logarithmischen Wachstumsphase zwei Stunden zuvor.

Das Ende der logarithmischen Wachstumsphase der Stämme von *A. odontolyticus* lag bei verwendeten Verdünnungen des Inokulums von 10⁻¹ bis 10⁻³ zwischen 16 und 20 Stunden. Die cremefarbenen Stämme von *A. odontolyticus* kamen in diesem Wachstumsstadium auf eine OD₆₅₀ von 0,225 bis 0,277. Zwischen einer OD₆₅₀ von 0,215 und 0,370 lagen die Extinktionen der rot pigmentierten Stämme.

Bei Einsatz eines unverdünnten bzw. auf 10⁻¹ verdünnten Inokulums erreichten die Stämme von *A. naeslundii* das Ende der logarithmischen Wachstumsphase nach 16 bis 20 Stunden. *A. naeslundii* erzielte dabei eine OD₆₅₀ von 0,139 bis 0,209 (Anhang

Tab. 2).

Die Messungen der *frühen stationären Wachstumsphase* erfolgten zwei Stunden nach dem Ende der logarithmischen Wachstumsphase. Bei allen Stämmen stiegen die Extinktionen weiter an. Die optische Dichte der cremefarbenen Stämme von *A. odontolyticus* lag bei einer OD_{650} von 0,340 bis 0,549, während die rot pigmentierten Stämme von *A. odontolyticus* eine OD_{650} von 0,361 bis 0,549 erreichten. Die Extinktion der Stämme von *A. naeslundii* lag zwischen einer OD_{650} von 0,279 und 0,512 (Anhang Tab. 3).

In der Abbildung 13 sind die Extinktionswerte für alle drei Stammgruppen in ihrer Wachstumskinetik zusammengefaßt dargestellt.

So ergaben sich für die drei Wachstumsphasen der cremefarbenen Stämme von *A. odontolyticus* mittlere optische Dichten von 0,117, 0,251 bzw. 0,441. Die Extinktionen der rot pigmentierten Stämme von *A. odontolyticus* lagen im Mittel bei einer OD_{650} von 0,134, 0,274 und 0,449. *A. naeslundii* erreichte mit niedrigeren mittleren Extinktionswerten das Ende der logarithmischen Wachstumsphase. Diese entsprachen im Mittel einer OD_{650} von 0,082 in der logarithmischen Wachstumsphase, einer OD_{650} von 0,179 am Ende der logarithmischen Wachstumsphase und einer OD_{650} von 0,348 in der frühen stationären Wachstumsphase (Abb. 13).

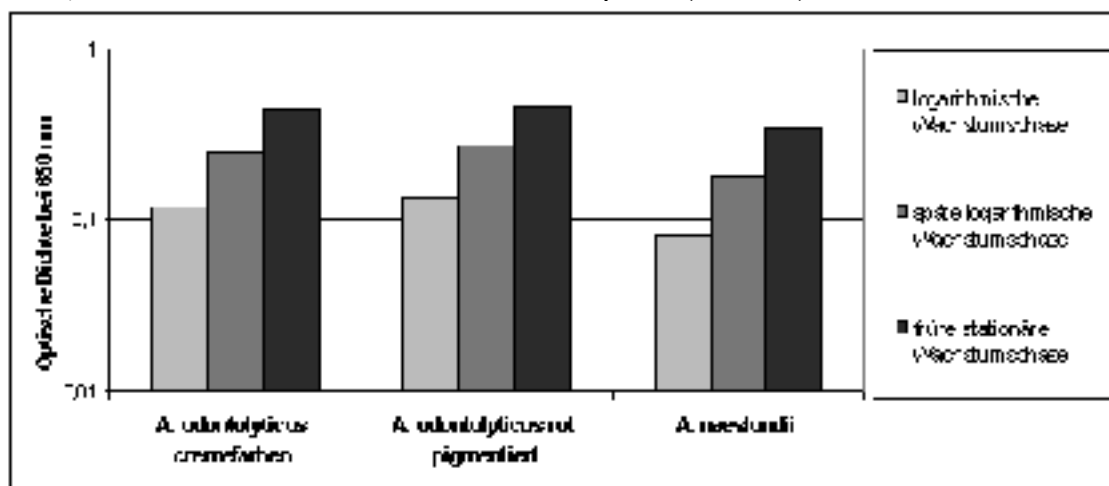


Abbildung 13: Extinktionen der Aktinomyzeten in Abhängigkeit von der Wachstumsphase

Nach dem Friedmann-Test lag bei den Extinktionen ein signifikanter Unterschied sowohl zwischen den Werten der logarithmischen Wachstumsphase und denen am Ende der logarithmischen Wachstumsphase vor als auch zwischen den Befunden am Ende der logarithmischen Wachstumsphase und denen der frühen stationären Wachstumsphase (Tab. 4). Der p-Wert lag immer unter 0,01 und zeigte damit einen hoch signifikanten

Unterschied auf.

Die cremefarbenen und rot pigmentierten Stämme von *A. odontolyticus* unterschieden sich in den Extinktionswerten in den logarithmischen und in der frühen stationären Wachstumsphase nicht voneinander; die jeweiligen p-Werte lagen deutlich über 0,05 (Tab. 5).

Tabelle 4: Exakte Signifikanzen (p-Werte, Friedman-Test) zwischen den Extinktionen in Abhängigkeit von der Wachstumsphase (Paardifferenzen zwischen früher [1] und später logarithmischer Wachstumsphase [2] und früher stationärer Wachstumsphase [3])

Paardifferenzen zwischen den Wachstumsphasen	<i>A. odontolyticus</i>			<i>A. naeslundii</i>
	cremefarben (n = 3)	rot pigmentiert (n = 5)	gesamt (n = 8)	gesamt (n = 5)
Extinktion				
1 – 2	0,004	0,000	0,000	0,000
2 – 3	0,008	0,000	0,000	0,000

p-Wert für Signifikanz $p \leq 0,05$

Tabelle 5: Extinktionen in der logarithmischen Wachstumsphase, am Ende der logarithmischen Wachstumsphase und in der frühen stationären Phase von cremefarbenen und rot pigmentierten Stämmen von *A. odontolyticus* (Mann-Whitney-U-Test)

	p-Wert	<i>A. odontolyticus</i>					
		cremefarben			rot pigmentiert		
		Median	\bar{x}	SD	Median	\bar{x}	SD
Logarithmische Wachstumsphase							
Extinktion	0,263	0,115	0,117	0,039	0,142	0,134	0,028
Ende der logarithmischen Wachstumsphase							
Extinktion	0,400	0,237	0,251	0,074	0,267	0,274	0,057
Frühe stationäre Phase							
Extinktion	0,764	0,431	0,441	0,102	0,438	0,449	0,074

p-Wert für Signifikanz $p \leq 0,05$

Da die verschieden pigmentierten Stämme von *A. odontolyticus* keinen Unterschied in

ihren Extinktionen zeigten, konnten sie zusammengefaßt und mit den entsprechenden Daten der Stämme von *A. naeslundii* verglichen werden. Die Extinktionen von *A. odontolyticus* lagen in allen drei Wachstumsphasen signifikant über den Extinktionen von *A. naeslundii*; die p-Werte lagen bei 0,000 und 0,001 (Tab. 6).

Tabelle 6: Wachstumskinetische Parameter in der logarithmischen Wachstumsphase, am Ende der logarithmischen Wachstumsphase und in der frühen stationären Phase von *A. odontolyticus* und *A. naeslundii* (Mann-Whitney-U-Test)

	<i>A. odontolyticus</i>				<i>A. naeslundii</i>		
	p-Wert	Median	\bar{x}	SD	Median	\bar{x}	SD
Logarithmische Wachstumsphase							
Extinktion	0,000	0,139	0,127	0,033	0,077	0,082	0,024
Ende der logarithmischen Wachstumsphase							
Extinktion	0,000	0,265	0,263	0,065	0,176	0,179	0,044
Frühe stationäre Phase							
Extinktion	0,001	0,438	0,446	0,083	0,339	0,348	0,108

p-Wert für Signifikanz $p \leq 0,05$

5.1.2.2 pH-Werte

In dem Maße wie die Extinktionen der Bakteriensuspensionen mit steigender Kultivierungszeit zunahmen, fielen die pH-Werte ab.

Während der *logarithmischen Wachstumsphase* lagen die pH-Werte im Kulturmedium der cremefarbenen Stämme von *A. odontolyticus* bei pH 6,42 bis pH 6,21, im Kulturmedium rot pigmentierter Stämme zwischen pH 6,46 und pH 6,23 und im Kulturmedium der Stämme von *A. naeslundii* bei Werten von pH 6,45 bis pH 6,00 (Anhang Tab. 1).

Bis zum *Ende der logarithmischen Wachstumsphase* sanken die pH-Werte in der Bouillon weiter. Die cremefarbenen Stämme von *A. odontolyticus* senkten den pH-Wert auf pH 6,10 bis pH 5,96 und die rot pigmentierten Stämme auf pH 6,46 bis pH 5,83. Bei *A. naeslundii* fielen die pH-Werte in der Bouillon auf pH 6,33 bis pH 5,70 ab (Anhang Tab. 2).

In der *frühen stationären Wachstumsphase* lagen die pH-Werte in den Kulturmedien am niedrigsten. Die cremefarbenen Stämme von *A. odontolyticus* senkten den pH-Wert auf 5,84 bis pH 5,13 und die rot pigmentierten Stämme auf pH 5,81 bis pH 5,37. Bei der Kultivierung von *A. naeslundii* fielen die pH-Werte in der Bouillon auf pH 6,11 bis pH 5,12 ab (Anhang Tab. 3).

In der Abbildung 14 sind die pH-Werte der Kulturmedien für alle drei Stammgruppen in ihrer Wachstumskinetik zusammengefaßt dargestellt.

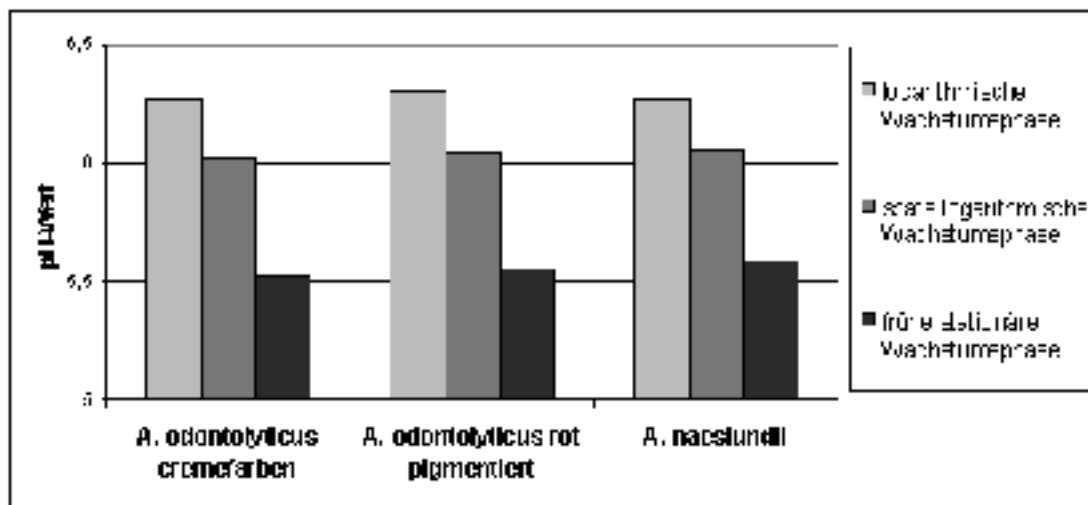


Abbildung 14: pH-Werte in den Kulturmedien in Beziehung zur Wachstumsphase der Actinomyzeten

Von der logarithmischen Wachstumsphase über das Ende der logarithmischen Wachstumsphase bis zur frühen stationären Phase fielen die pH-Werte in der Bouillon der cremefarbenen Stämme von *A. odontolyticus* im Durchschnitt von pH 6,27 auf pH 6,03 bzw. auf pH 5,53. Die analogen pH-Werte für die rot pigmentierten Stämme von *A. odontolyticus* lagen im zweistündigen Intervall im Mittel bei pH 6,30, pH 6,04 und pH 5,55. Bei Kultivierung der Stämme von *A. naeslundii* fiel der mittlere pH-Wert von pH 6,27 auf pH 6,06 am Ende der logarithmischen Wachstumsphase und auf pH 5,59 in der frühen stationären Phase ab (Abb. 14).

Der statistische Vergleich der pH-Werte zwischen den einzelnen Wachstumsphasen zeigte bei allen Stammgruppen einen signifikanten Unterschied. Der pH-Wert nahm signifikant von einer Wachstumsphase zur nächsten ab (Tab. 7).

Tabelle 7: Exakte Signifikanzen (p-Werte, Friedman-Test) zu den pH-Werten in Abhängigkeit von der Wachstumsphase (Paardifferenzen zwischen früher [1] und später logarithmischer Wachstumsphase [2] und früher stationärer Wachstumsphase [3])

Paardifferenzen zwischen den Wachstumsphasen	<i>A. odontolyticus</i>			<i>A. naeslundii</i>
	cremefarben (n = 3)	rot pigmentiert (n = 5)	gesamt (n = 8)	gesamt (n = 5)
pH				
1 – 2	0,039	0,003	0,000	0,000
2 – 3	0,008	0,000	0,000	0,000

p-Wert für Signifikanz $p \leq 0,05$

Der Vergleich der pH-Werte zwischen den cremefarbenen und rot pigmentierten Stämmen von *A. odontolyticus* zeigte statistisch keinen Unterschied zwischen beiden Stammgruppen auf. Die p-Werte lagen deutlich über 0,05 (Tab. 8).

Die zusammengefaßten pH-Werte in der DNB während der drei Wachstumsphasen der beiden Gruppen von *A. odontolyticus* unterschieden sich nicht signifikant von den pH-Werten, die die Stämme von *A. naeslundii* in der Bouillon erreichten. Die p-Werte lagen über 0,05 (Tab. 9).

Tabelle 8: Wachstumskinetische Parameter in der logarithmischen Wachstumsphase, am Ende der logarithmischen Wachstumsphase und in der frühen stationären Phase von cremefarbenen und rot pigmentierten Stämmen von *A. odontolyticus* (Mann-Whitney-U-Test)

	p-Wert	<i>A. odontolyticus</i>					
		cremefarben			rot pigmentiert		
		Median	\bar{x}	SD	Median	\bar{x}	SD
Logarithmische Wachstumsphase							
pH	0,861	6,29	6,27	0,15	6,33	6,30	0,11
Ende der logarithmischen Wachstumsphase							
pH	0,505	6,08	6,03	0,22	5,94	6,04	0,24
Frühe stationäre Phase							
pH	0,868	5,64	5,53	0,36	5,52	5,55	0,19

p-Wert für Signifikanz $p \leq 0,05$

Tabelle 9: pH-Werte in der logarithmischen Wachstumsphase, am Ende der logarithmischen Wachstumsphase und in der frühen stationären Wachstumsphase von *A. odontolyticus* und *A. naeslundii* (Mann-Whitney-U-Test)

	<i>A. odontolyticus</i>				<i>A. naeslundii</i>		
	p-Wert	Median	\bar{x}	SD	Median	\bar{x}	SD
Logarithmische Wachstumsphase							
pH	0,962	6,30	6,29	0,13	6,28	6,27	0,18
Ende der logarithmischen Wachstumsphase							
pH	0,624	6,02	6,04	0,23	6,14	6,06	0,28
Frühe stationäre Phase							
pH	0,672	5,54	5,54	0,26	5,61	5,59	0,36

p-Wert für Signifikanz $p \leq 0,05$

5.2 Säureproduktion und Säuretoleranz

5.2.1 Säureproduktionen der Aktinomyzeten bei unterschiedlichen pH-Werten in den drei verschiedenen Wachstumsphasen

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Wachstumsphase mit der höchsten Säureproduktion der Aktinomyzeten aufzuzeigen und die Säuretoleranz der Stämme zu ermitteln. Die Stämme wurden nach standardisierter Animpfung (siehe Kap. 4.2) deshalb zwischen 14- und 23-stündiger Kultivierung geerntet (Anhang Tab. 1 bis 3), um Biomasse der logarithmischen, der späten logarithmischen und frühen stationären Wachstumsphase zur Bestimmung der Säureproduktion einsetzen zu können. Die ebenfalls standardisierten Meßansätze (siehe Kap. 4.2 und 4.3) wurden darüber hinaus jeweils auf pH-Werte von pH 8,0, pH 7,0, pH 6,0 und pH 5,0 eingestellt und die Messungen gestartet, um die Säuretoleranz (siehe Kap. 4.4), also die Säuremenge im Vergleich zur optimalen Säureproduktion, nachfolgend prozentual ausdrücken zu können.

5.2.1.1 Säureproduktion bei pH 8,0

Die Säureproduktion bei pH 8,0 war in der *logarithmischen Wachstumsphase* bei den cremefarbenen Stämmen von *A. odontolyticus* sehr verschieden. Der Stamm R6/88

produzierte mit $88 \text{ nmol[H}^+]\text{min}^{-1}$ wenig Säure, während der Stamm W55/1007 mit $188 \text{ nmol[H}^+]\text{min}^{-1}$ viel Säure produzierte. Der dritte Stamm lag mit seiner Säuremenge zwischen der der beiden letztgenannten Stämme. Die Säureproduktion der rot pigmentierten Stämme von *A. odontolyticus* lag hauptsächlich zwischen 147 und $169 \text{ nmol[H}^+]\text{min}^{-1}$ Säure. Nur der Stamm W26/386 war mit $246 \text{ nmol[H}^+]\text{min}^{-1}$ deutlich produktiver. Die Säuremengen der Stämme von *A. naeslundii* lagen über denen der Stämme von *A. odontolyticus*. Sie erreichten zwischen 192 und $261 \text{ nmol[H}^+]\text{min}^{-1}$ (Tab. 10).

Am Ende der logarithmischen Wachstumsphase produzierten die cremefarbenen Stämme von *A. odontolyticus* Säuremengen zwischen 121 und $198 \text{ nmol[H}^+]\text{min}^{-1}$. Die Werte der rot pigmentierten Stämme lagen mit 138 bis $190 \text{ nmol[H}^+]\text{min}^{-1}$ im gleichen Bereich. Lediglich der Stamm W26/386 bildete mit $278 \text{ nmol[H}^+]\text{min}^{-1}$ mehr Säure. Die Säuremengen der Stämme von *A. naeslundii* lagen bei pH 8,0 zwischen 221 und $302 \text{ nmol[H}^+]\text{min}^{-1}$. Die höchste Säureproduktion zeigte der Stamm R3/35 (Tab. 10).

In der frühen stationären Wachstumsphase sanken die produzierten Säuremengen wieder ab. Die cremefarbenen Stämme von *A. odontolyticus* bildeten zwischen 97 und $176 \text{ nmol[H}^+]\text{min}^{-1}$ und die rot pigmentierten Stämme zwischen 109 und $234 \text{ nmol[H}^+]\text{min}^{-1}$. Die Werte für *A. naeslundii* lagen zwischen 181 und $233 \text{ nmol[H}^+]\text{min}^{-1}$ (Tab. 10). In Abbildung 15 ist die Säureproduktion aller Stämme in den unterschiedlichen Wachstumsphasen bei pH 8,0 zusammenfassend dargestellt.

Die cremefarbenen Stämme von *A. odontolyticus* zeigten im Durchschnitt eine Säureproduktion von 116, 156 und $136 \text{ nmol[H}^+]\text{min}^{-1}$ in den drei Wachstumsphasen. Die rot pigmentierten Stämme von *A. odontolyticus* bildeten im Mittel $183 \text{ nmol[H}^+]\text{min}^{-1}$ in der logarithmischen Wachstumsphase, $191 \text{ nmol[H}^+]\text{min}^{-1}$ am Ende der logarithmischen Wachstumsphase und $162 \text{ nmol[H}^+]\text{min}^{-1}$ in der frühen stationären Wachstumsphase. Die durchschnittliche Säureproduktion der Stämme von *A. naeslundii* lag mit 232, 256 und $207 \text{ nmol[H}^+]\text{min}^{-1}$ deutlich höher als die der Stämme von *A. odontolyticus* (Abb. 15).

Die Mittelwerte zwischen der logarithmischen und späten logarithmischen Wachstumsphase waren nur bei den cremefarbenen Stämmen von *A. odontolyticus* signifikant verschieden. Dagegen lag zwischen der späten logarithmischen Wachstumsphase und der frühen stationären Wachstumsphase bei allen drei Stammgruppen ein signifikanter Unterschied vor (Tab. 11).

Tabelle 10: Säureproduktionen (nmol[H⁺]min⁻¹) bei pH 8,0 der einzelnen Aktinomyzetenstämme während der verschiedenen Wachstumsphasen

Stamm-Nr.	WACHSTUMSPHASE		
	frühe logarithmische $\bar{x} \pm SD$	späte logarithmische $\bar{x} \pm SD$	frühe stationäre $\bar{x} \pm SD$
<i>A. odontolyticus</i> cremefarben			
R4/59	102 10	138 16	136 1
R6/88	88 8	121 3	97 4
W55/1007	188 15	198 24	176 16
<i>A. odontolyticus</i> rot pigmentiert			
R22/580	161 33	138 17	126 21
R48/1355	164 12	169 3	109 1
W8/112	169 15	190 0	166 19
W17/216	147 10	143 11	124 16
W26/386	246 39	278 11	234 30
<i>A. naeslundii</i>			
R3/35	233 45	302 33	227 26
R29/794	192 13	238 15	181 5
R24/661	234 30	226 18	212 24
R38/1034	246 0	221 16	189 30
W54/981	261 3	294 14	233 4

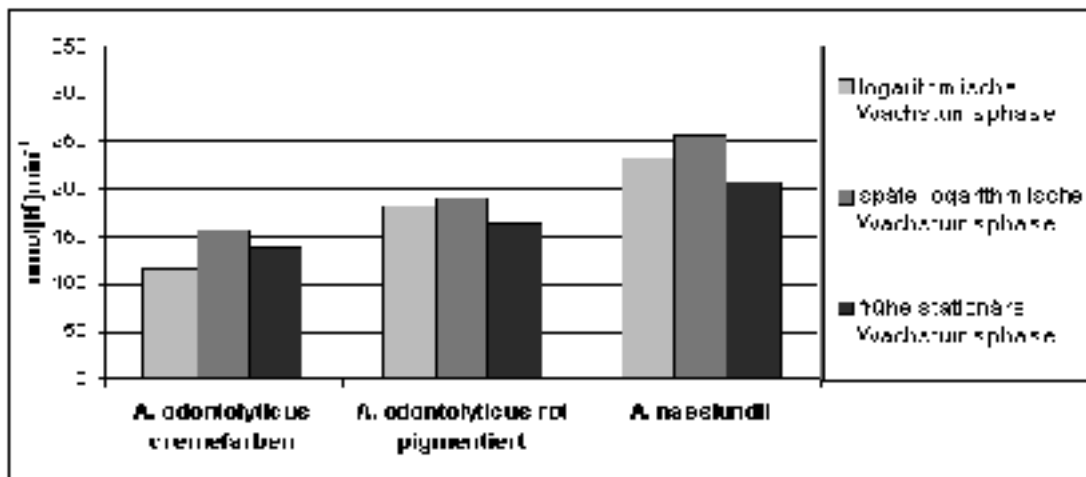


Abbildung 15: Säureproduktion der Aktinomyzeten bei pH 8,0 in Abhängigkeit von der Wachstumsphase

Tabelle 11: Exakte Signifikanzen (p-Werte, Friedmann-Test) zur Säureproduktion der Aktinomyzeten bei pH 8,0 in Abhängigkeit von der Wachstumsphase (Paardifferenzen zwischen früher [1] und später logarithmischer Wachstumsphase [2] und früher stationärer Wachstumsphase [3])

Paardifferenzen zwischen den Wachstumsphasen	<i>A. odontolyticus</i> cremefarben (n = 3)	<i>A. odontolyticus</i> rot pigmentiert (n = 5)	gesamt (n = 8)	<i>A. naeslundii</i> gesamt (n = 5)
pH 8,0				
1 – 2	0,004	1,000	0,078	0,508
2 – 3	0,008	0,039	0,000	0,007

p-Wert für Signifikanz $p \leq 0,05$

Wurden anschließend die Säureproduktionen der cremefarbenen Stämme mit denen der rot pigmentierten Stämme von *A. odontolyticus* verglichen, so zeigte sich nur in der logarithmischen Wachstumsphase ein statistischer Unterschied, während die Säureproduktionen am Ende der logarithmischen und in der frühen stationären Wachstumsphase nicht mehr signifikant verschieden waren (Tab. 12).

Beim Vergleich der Säureproduktionen von *A. odontolyticus* mit *A. naeslundii* wurde in allen drei Wachstumsphasen ein hoch signifikanter Unterschied deutlich. Die p-Werte lagen bei 0,000 (Tab. 13).

Tabelle 12: Säureproduktionen bei pH 8,0 in der logarithmischen Wachstumsphase, am Ende der logarithmischen Wachstumsphase und in der frühen stationären Phase von cremefarbenen und rot pigmentierten Stämmen von *A. odontolyticus* (Mann-Whitney-U-Test)

	p-Wert	<i>A. odontolyticus</i>					
		cremefarben	rot pigmentiert				
		Median	\bar{x}	SD	Median	\bar{x}	SD
Logarithmische Wachstumsphase							
pH 8,0	0,004	96	116	42	172	183	46
Ende der logarithmischen Wachstumsphase							
pH 8,0	0,150	143	156	37	169	191	60
Frühe stationäre Phase							
pH 8,0	0,238	136	136	37	142	162	56

p-Wert für Signifikanz $p \leq 0,05$

Tabelle 13: Säureproduktionen von *A. odontolyticus* und *A. naeslundii* (Mann-Whitney-U-Test) bei pH 8,0 in der logarithmischen Wachstumsphase, am Ende der logarithmischen Wachstumsphase und in der frühen stationären Phase

		<i>A. odontolyticus</i>			<i>A. naeslundii</i>		
	p-Wert	Median	\bar{x}	SD	Median	\bar{x}	SD
Logarithmische Wachstumsphase							
pH 8,0	0,000	156	158	54	246	232	32
Ende der logarithmischen Wachstumsphase							
pH 8,0	0,000	158	173	52	247	256	38
Frühe stationäre Phase							
pH 8,0	0,000	140	152	50	209	207	28

p-Wert für Signifikanz $p \leq 0,05$

5.2.1.2 Säureproduktion bei pH 7,0

In der *logarithmischen Wachstumsphase* zeigte der cremefarbene Stamm *A. odontolyticus* W55/1007 mit $261 \text{ nmol}[\text{H}^+]\text{min}^{-1}$ die höchste Säureproduktion der Stämme von *A. odontolyticus* bei pH 7,0. Die beiden anderen Stämme produzierten 186 bzw. 166 $\text{nmol}[\text{H}^+]\text{min}^{-1}$. Die rot pigmentierten Stämme von *A. odontolyticus* bildeten zwischen 174 und 229 $\text{nmol}[\text{H}^+]\text{min}^{-1}$. Der Stamm W26/386 produzierte als einziger Stamm bei pH 8,0 mehr Säure als bei pH 7,0. Mit einer Säuremenge zwischen 245 und 280 $\text{nmol}[\text{H}^+]\text{min}^{-1}$ bildeten die Stämme von *A. naeslundii* mehr Säure als die Stämme von *A. odontolyticus*. Der Stamm W54/981 bildete mit $345 \text{ nmol}[\text{H}^+]\text{min}^{-1}$ mit Abstand die größte Säuremenge in der logarithmischen Wachstumsphase (Tab. 14).

Am Ende der *logarithmischen Wachstumsphase* wies wieder der Stamm W55/1007 mit $312 \text{ nmol}[\text{H}^+]\text{min}^{-1}$ die höchste Säureproduktion bei den cremefarbenen Stämmen von *A. odontolyticus* auf. Die beiden anderen Stämme zeigten eine Säureproduktion von 177 bzw. 223 $\text{nmol}[\text{H}^+]\text{min}^{-1}$. Die rot pigmentierten Stämme von *A. odontolyticus* produzierten zwischen 198 und 256 $\text{nmol}[\text{H}^+]\text{min}^{-1}$, wobei der Stamm W26/386 zuvor bei pH 8,0 mehr Säure produzierte. Unter den Stämmen von *A. naeslundii* produzierte der Stamm R3/35 mit $271 \text{ nmol}[\text{H}^+]\text{min}^{-1}$ die geringste Säuremenge und wies bei pH 8,0 mit $302 \text{ nmol}[\text{H}^+]\text{min}^{-1}$ eine höhere Säureproduktion auf. Der Stamm W54/981 erwies sich mit $383 \text{ nmol}[\text{H}^+]\text{min}^{-1}$ auch am Ende der logarithmischen Wachstumsphase als der größte Säureproduzent. Die Säuremengen der übrigen drei Stämme lagen zwischen diesen Bereichen (Tab. 14).

In der *frühen stationären Wachstumsphase* fielen die Säuremengen wieder ab. Die Säureproduktion der cremefarbenen Stämme von *A. odontolyticus* lag zwischen 137 und 244 $\text{nmol}[\text{H}^+]\text{min}^{-1}$. In ähnlicher Größenordnung lag die Säureproduktion der rot pigmentierten Stämme. Sie bildeten zwischen 147 und 223 $\text{nmol}[\text{H}^+]\text{min}^{-1}$, wobei der Stamm W26/386 in dieser Wachstumsphase wieder seine höchste Säureproduktion bei pH 8,0 hatte. 217 bis 308 $\text{nmol}[\text{H}^+]\text{min}^{-1}$ erreichten die Stämme von *A. naeslundii*; der Stamm R3/35 produzierte allerdings bei pH 8,0 eine größere Säuremenge (Tab. 14).

Zusammengefaßt bildeten die cremefarbenen Stämme von *A. odontolyticus* im Mittel 196, 245 und 191 $\text{nmol}[\text{H}^+]\text{min}^{-1}$ in der logarithmischen Wachstumsphase, am Ende der logarithmischen bzw. in der frühen stationären Wachstumsphase (Abb. 16). Die rot pigmentierten Stämme von *A. odontolyticus* produzierten mit 199, 229 und 191 $\text{nmol}[\text{H}^+]\text{min}^{-1}$ annähernd die gleichen Säuremengen in den drei Wachstumsphasen wie

Tabelle 14: Säureproduktionen (nmol[H⁺]/min⁻¹) bei pH 7,0 der einzelnen Aktinomyzetenstämme während der verschiedenen Wachstumsphasen

Stamm-Nr.	WACHSTUMSPHASE		
	frühe logarithmische $\bar{x} \pm SD$	späte logarithmische $\bar{x} \pm SD$	frühe stationäre $\bar{x} \pm SD$
<i>A. odontolyticus</i> cremefarben			
R4/59	186 13	223 7	191 3
R6/88	166 4	177 2	137 13
W55/1007	261 27	312 16	244 10
<i>A. odontolyticus</i> rot pigmentiert			
R22/580	210 4	242 7	202 23
R48/1355	174 13	210 11	174 6
W8/112	196 7	232 15	196 16
W17/216	174 20	198 13	147 8
W26/386	229 11	256 13	223 8
<i>A. naeslundii</i>			
R3/35	245 14	271 18	217 23
R29/794	254 11	308 11	228 17
R24/661	280 24	327 13	288 7
R38/1034	262 4	289 14	236 28
W54/981	345 19	383 21	308 15

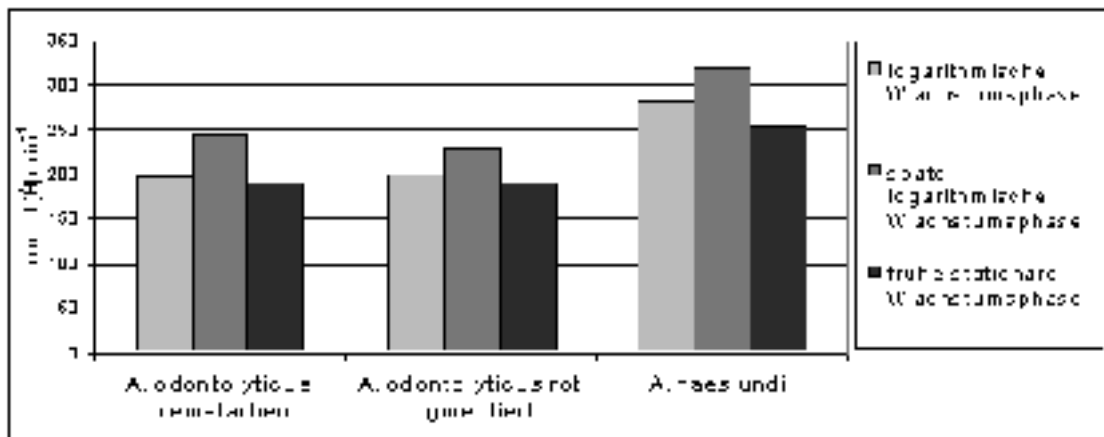


Abbildung 16: Säureproduktion der Aktinomyzeten bei pH 7,0 in Abhängigkeit von der Wachstumsphase

die cremefarbenen Stämme. Die Stämme von *A. naeslundii* bildeten in allen drei Wachstumsphasen die größte Säuremenge; sie produzierten 281, 318 und 254 nmol[H⁺] min⁻¹ (Abb. 16).

In allen drei Stammgruppen der Aktinomyzeten lag bei den Säureproduktionen zwischen den aufeinanderfolgenden Wachstumsphasen ein signifikanter Unterschied vor (Tab. 15). Die Säureproduktion nahm zum Ende der logarithmischen Wachstumsphase signifikant zu und fiel danach wieder signifikant ab.

Tabelle 15: Exakte Signifikanzen (p-Werte, Friedman-Test) zur Säureproduktion der Aktinomyzeten bei pH 7,0 in Abhängigkeit von der Wachstumsphase (Paardifferenzen zwischen früher [1] und später logarithmischer Wachstumsphase [2] und früher stationärer Wachstumsphase [3])

Paardifferenzen zwischen den Wachstumsphasen	<i>A. odontolyticus</i>			<i>A. naeslundii</i>
	cremfarben (n = 3)	rot pigmentiert (n = 5)	gesamt (n = 8)	gesamt (n = 5)
pH 7,0				
1 – 2	0,004	0,003	0,000	0,000
2 – 3	0,008	0,000	0,000	0,000

p-Wert für Signifikanz $p \leq 0,05$

Beim Vergleich der Säureproduktionen von cremefarbenen und rot pigmentierten Stämmen von *A. odontolyticus* konnte kein statistischer Unterschied nachgewiesen werden. Beide Stammgruppen produzierten gleich viel Säure bei pH 7,0 (Tab. 16).

Tabelle 16: Säureproduktionen bei pH 7,0 in der logarithmischen Wachstumsphase, am Ende der logarithmischen Wachstumsphase und in der frühen stationären Phase von cremefarbenen und rot pigmentierten Stämmen von *A. odontolyticus* (Mann-Whitney-U-Test)

	p-Wert	<i>A. odontolyticus</i>					
		cremefarben	rot pigmentiert				
		Median	\bar{x}	SD	Median	\bar{x}	SD
Logarithmische Wachstumsphase							
pH 7,0	0,411	185	196	40	195	199	25
Ende der logarithmischen Wachstumsphase							
pH 7,0	0,813	225	245	56	233	229	25
Frühe stationäre Phase							
pH 7,0	0,920	191	191	51	195	191	31

p-Wert für Signifikanz $p \leq 0,05$

Dagegen unterschieden sich die Säureproduktionen der Stämme von *A. odontolyticus* und *A. naeslundii* signifikant. *A. naeslundii* produzierte signifikant mehr Säure als die Stämme von *A. odontolyticus* (Tab. 17).

Tabelle 17: Säureproduktionen von *A. odontolyticus* und *A. naeslundii* (Mann-Whitney-U-Test) bei pH 7,0 in der logarithmischen Wachstumsphase, am Ende der logarithmischen Wachstumsphase und in der frühen stationären Phase

		<i>A. odontolyticus</i>			<i>A. naeslundii</i>		
	p-Wert	Median	\bar{x}	SD	Median	\bar{x}	SD
Logarithmische Wachstumsphase							
pH 7,0	0,000	192	198	30	264	281	41
Ende der logarithmischen Wachstumsphase							
pH 7,0	0,000	228	237	43	311	318	42
Frühe stationäre Phase							
pH 7,0	0,000	191	191	38	248	254	40

p-Wert für Signifikanz $p \leq 0,05$

5.2.1.3 Säureproduktion bei pH 6,0

Bei pH 6,0 schwankten die Säuremengen zwischen den einzelnen Stämmen sehr. In der *logarithmischen Wachstumsphase* lagen die Stämme R4/59 und R6/88 der cremefarbenen Stämme mit 62 bzw. 42 nmol[H⁺]/min⁻¹ nahe beieinander. Im Vergleich zu ihnen bildete der Stamm W55/1007 mit 193 nmol[H⁺]/min⁻¹ wesentlich mehr Säure. Anders verhielten sich die rot pigmentierten Stämme von *A. odontolyticus*. Sie produzierten mit 105 bis 116 nmol[H⁺]/min⁻¹ nahezu gleich viel Säure. Allerdings konnten für den Stamm R22/580 in der logarithmischen Wachstumsphase bei pH 6,0 keine Daten erhoben werden, weil nicht genügend Biomasse vorlag. Die Säureproduktion der Stämme von *A. naeslundii* lag mit 112 und 136 nmol[H⁺]/min⁻¹ nur leicht über der der Stämme von *A. odontolyticus*. Daten für die Stämme R3/35 und R38/1034 lagen nicht vor, da in dieser frühen Wachstumsphase noch keine ausreichende Biomasse für die Messungen zur Verfügung stand (Tab. 18).

Am Ende der *logarithmischen Wachstumsphase* lag die Säureproduktion der cremefarbenen Stämme von *A. odontolyticus* zwischen 55 und 208 nmol[H⁺]/min⁻¹. Die rot pigmentierten Stämme von *A. odontolyticus* produzierten zwischen 121 und 150 nmol[H⁺]/min⁻¹, während die Säuremengen der Stämme von *A. naeslundii* mit 109 bis 184 nmol[H⁺]/min⁻¹ nur geringfügig darüber lagen (Tab. 18).

In der *frühen stationären Wachstumsphase* lagen die Säuremengen zwischen 41 und 180 nmol[H⁺]/min⁻¹ bzw. zwischen 101 und 165 nmol[H⁺]/min⁻¹ bei den cremefarbenen bzw. rot pigmentierten Stämmen von *A. odontolyticus*. Die Stämme von *A. naeslundii* produzierten zwischen 88 und 144 nmol[H⁺]/min⁻¹ (Tab. 18).

Im Durchschnitt produzierten die cremefarbenen Stämme von *A. odontolyticus* 74 nmol [H⁺]/min⁻¹ in der logarithmischen Wachstumsphase, 134 nmol[H⁺]/min⁻¹ am Ende der logarithmischen Wachstumsphase und 106 nmol[H⁺]/min⁻¹ in der frühen stationären Wachstumsphase. Die rot pigmentierten Stämme von *A. odontolyticus* bildeten im Mittel 108, 137 und 116 nmol[H⁺]/min⁻¹. Die Stämme von *A. naeslundii* erreichten in allen drei Wachstumsphasen mit 120, 147 und 121 nmol[H⁺]/min⁻¹ kaum höhere Werte als die Stämme von *A. odontolyticus* (Abb. 17).

Tabelle 18: Säureproduktionen (nmol[H⁺]/min⁻¹) bei pH 6,0 der einzelnen Aktinomyzetenstämme während der verschiedenen Wachstumsphasen

Stamm-Nr.	WACHSTUMSPHASE		
	frühe logarithmische $\bar{x} \pm SD$	späte logarithmische $\bar{x} \pm SD$	frühe stationäre $\bar{x} \pm SD$
<i>A. odontolyticus</i> cremefarben			
R4/59	62 11	112 22	81 0
R6/88	42 2	55 2	41 10
W55/1007	193 0	208 19	180 15
<i>A. odontolyticus</i> rot pigmentiert			
R22/580	zu wenig Biomasse	130 8	130 18
R48/1355	116 20	150 4	165 19
W8/112	109 11	148 5	101 13
W17/216	105 49	144 11	104 6
W26/386	105 10	121 17	102 24
<i>A. naeslundii</i>			
R3/35	zu wenig Biomasse	151 1	129 8
R29/794	112 8	154 23	139 4
R24/661	112 8	122 15	119 8
R38/1034	zu wenig Biomasse	109 28	88 19
W54/981	136 22	184 17	144 31

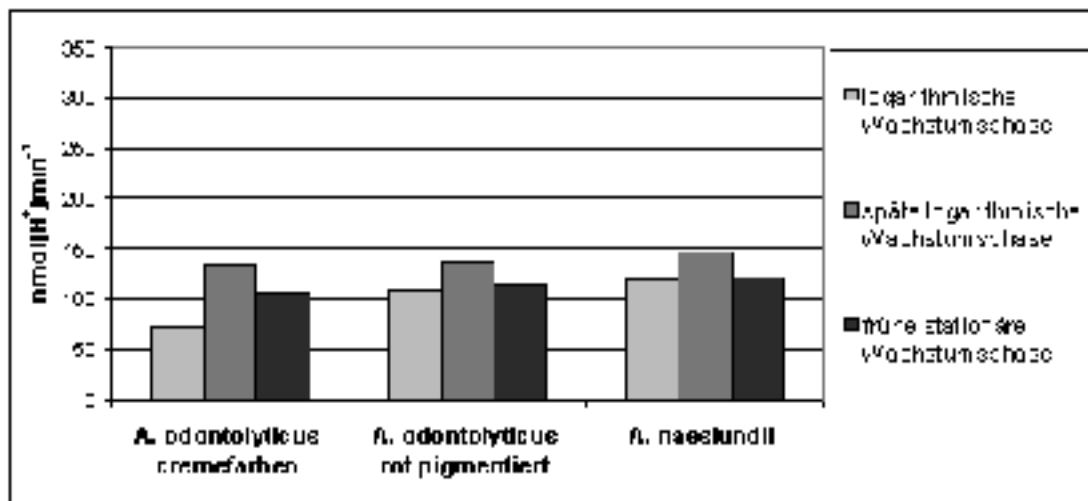


Abbildung 17: Säureproduktion der Aktinomyzeten bei pH 6,0 in Abhängigkeit von der Wachstumsphase

Auch bei pH 6,0 lag ein signifikanter Unterschied der Säureproduktionen in den aufeinanderfolgenden Wachstumsphasen sowohl bei den Stämmen von *A. odontolyticus* als auch bei denen von *A. naeslundii* vor (Tab. 19). Die größte Säuremenge wurde in der späten logarithmischen Wachstumsphase gebildet.

Tabelle 19: Exakte Signifikanzen (p-Werte, Friedmann-Test) zur Säureproduktion der Aktinomyzeten bei pH 6,0 in Abhängigkeit von der Wachstumsphase (Paardifferenzen zwischen früher [1] und später logarithmischer Wachstumsphase [2] und früher stationärer Wachstumsphase [3])

Paardifferenzen zwischen den Wachstumsphasen	<i>A. odontolyticus</i> cremefarben (n = 3)	<i>A. odontolyticus</i> rot pigmentiert (n = 5)	gesamt (n = 8)	<i>A. naeslundii</i> gesamt (n = 5)
pH 6,0				
1 – 2	0,031	0,012	0,000	0,031
2 – 3	0,016	0,022	0,000	0,092

p-Wert für Signifikanz $p \leq 0,05$

Außer in der logarithmischen Wachstumsphase unterschieden sich die gebildeten Säuremengen der verschiedenfarbigen Stämme von *A. odontolyticus* nicht signifikant, und eine gleiche Säureproduktion lag auch zwischen Stämmen von *A. odontolyticus* und *A. naeslundii* vor (Tab. 20 und 21).

Tabelle 20: Säureproduktionen bei pH 6,0 in der logarithmischen Wachstumsphase, am Ende der logarithmischen Wachstumsphase und in der frühen stationären Phase von cremefarbenen und rot pigmentierten Stämmen von *A. odontolyticus* (Mann-Whitney-U-Test)

	p-Wert	<i>A. odontolyticus</i>					
		cremefarben			rot pigmentiert		
		Median	\bar{x}	SD	Median	\bar{x}	SD
Logarithmische Wachstumsphase							
pH 6,0	0,036	49	74	59	111	108	22
Ende der logarithmischen Wachstumsphase							
pH 6,0	0,477	122	134	64	135	137	15
Frühe stationäre Phase							
pH 6,0	0,643	81	106	71	109	116	28

p-Wert für Signifikanz $p \leq 0,05$

Tabelle 21: Säureproduktionen von *A. odontolyticus* und *A. naeslundii* (Mann-Whitney-U-Test) bei pH 6,0 in der logarithmischen Wachstumsphase, am Ende der logarithmischen Wachstumsphase und in der frühen stationären Phase

		<i>A. odontolyticus</i>			<i>A. naeslundii</i>		
	p-Wert	Median	\bar{x}	SD	Median	\bar{x}	SD
Logarithmische Wachstumsphase							
pH 6,0	0,106	102	97	40	117	120	17
Ende der logarithmischen Wachstumsphase							
pH 6,0	0,261	135	135	45	150	147	33
Frühe stationäre Phase							
pH 6,0	0,438	109	113	46	123	121	27

p-Wert für Signifikanz $p \leq 0,05$

5.2.1.4 Säureproduktion bei pH 5,0

In der *logarithmischen Wachstumsphase* konnten nur fünf Stämme bei pH 5,0 untersucht werden. Der cremefarbene Stamm R6/88 produzierte $12 \text{ nmol[H}^+]\text{min}^{-1}$. Die drei rot pigmentierten Stämme W8/112, W17/216 und W26/386 bildeten 44, 32 und $25 \text{ nmol[H}^+]\text{min}^{-1}$. Der Stamm W54/981 von *A. naeslundii* erreichte $34 \text{ nmol[H}^+]\text{min}^{-1}$ (Tab. 22). Am Ende der *logarithmischen Wachstumsphase* lag genügend Biomasse vor, und alle Stämme konnten wieder untersucht werden. Die cremefarbenen Stämme von *A. odontolyticus* produzierten zwischen 18 und $68 \text{ nmol[H}^+]\text{min}^{-1}$. Mit 20 bis $58 \text{ nmol[H}^+]\text{min}^{-1}$ bildeten die rot pigmentierten Stämme etwa genauso viel Säure wie die cremefarbenen Stämme. Bei pH 5,0 lag die Säureproduktion der Stämme von *A. naeslundii* nicht mehr über der der Stämme von *A. odontolyticus*. Sie lag zwischen 27 und $51 \text{ nmol[H}^+]\text{min}^{-1}$ (Tab. 22).

In der *frühen stationären Wachstumsphase* lagen die Säuremengen zwischen 6 und $68 \text{ nmol[H}^+]\text{min}^{-1}$ bzw. zwischen 26 und $76 \text{ nmol[H}^+]\text{min}^{-1}$ bei den cremefarbenen bzw. rot pigmentierten Stämmen von *A. odontolyticus*. Die Stämme von *A. naeslundii* produzierten zwischen 24 und $47 \text{ nmol[H}^+]\text{min}^{-1}$ (Tab. 22).

In Abbildung 18 sind die Mittelwerte der Säureproduktionen bei pH 5,0 der drei Stammgruppen zusammengefaßt. So produzierten die cremefarbenen Stämme von *A. odontolyticus* $12 \text{ nmol[H}^+]\text{min}^{-1}$ in der logarithmischen Wachstumsphase, $53 \text{ nmol[H}^+]\text{min}^{-1}$ am Ende der logarithmischen Wachstumsphase und in der frühen stationären Wachstumsphase $37 \text{ nmol[H}^+]\text{min}^{-1}$. Die rot pigmentierten Stämme von *A. odontolyticus* bildeten im Mittel 34, 43 und $42 \text{ nmol[H}^+]\text{min}^{-1}$. Die Stämme von *A. naeslundii* lagen in allen drei Wachstumsphasen mit 34, 36 und $38 \text{ nmol[H}^+]\text{min}^{-1}$ unter oder gleich der Säureproduktion der Stämme von *A. odontolyticus* (Abb. 18).

Tabelle 22: Säureproduktionen (nmol[H⁺]min⁻¹) bei pH 5,0 der Aktinomyzetenstämme während der logarithmischen Wachstumsphase

Stamm-Nr.	WACHSTUMSPHASE		
	frühe logarithmische $\bar{x} \pm SD$	späte logarithmische $\bar{x} \pm SD$	frühe stationäre $\bar{x} \pm SD$
<i>A. odontolyticus</i> cremefarben			
R4/59	zu wenig Biomasse	53 22	68 0
R6/88	12 0	18 0	6 0
W55/1007	zu wenig Biomasse	68 11	48 11
<i>A. odontolyticus</i> rot pigmentiert			
R22/580	zu wenig Biomasse	20 7	38 2
R48/1355	zu wenig Biomasse	58 5	76 0
W8/112	44 0	68 7	50 18
W17/216	32 0	28 4	26 10
W26/386	25 0	46 21	43 19
<i>A. naeslundii</i>			
R3/35	zu wenig Biomasse	27 6	24 17
R29/794	zu wenig Biomasse	31 5	47 16
R24/661	zu wenig Biomasse	31 3	31 5
R38/1034	zu wenig Biomasse	51 17	45 14
W54/981	34 6	45 8	36 13

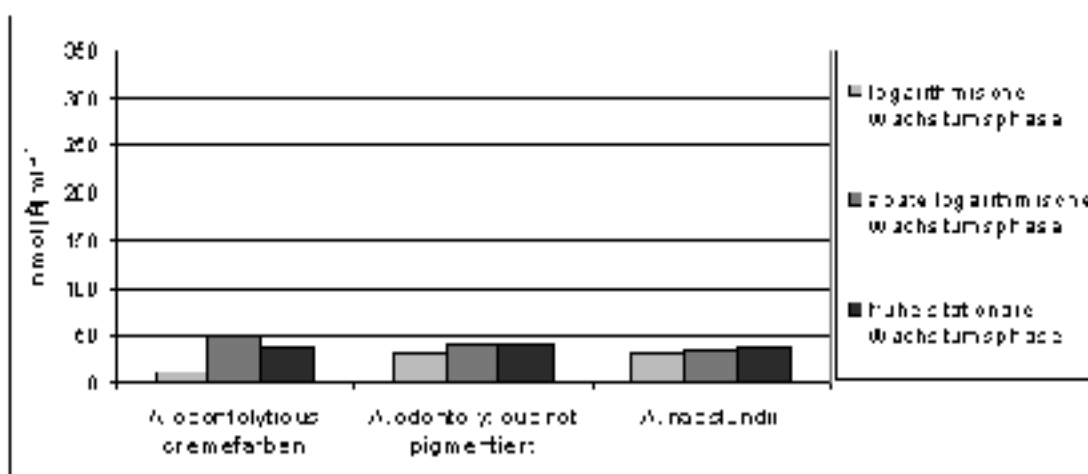


Abbildung 18: Säureproduktion der Aktinomyzeten bei pH 5,0 in Abhängigkeit von der Wachstumsphase

Im sauren Milieu von pH 5,0 konnte bei allen Stammgruppen statistisch keine wachstumskinetische Abhängigkeit des Säurebildungsvermögens nachgewiesen werden (Tab. 23). Aufgrund der geringen Biomasse in der logarithmischen Wachstumsphase konnte bei *A. naeslundii* nur die statistische Berechnung zwischen dem Ende der logarithmischen Wachstumsphase und der frühen stationären Wachstumsphase durchgeführt werden.

Tabelle 23: Exakte Signifikanzen (p-Werte, Friedmann-Test) zur Säureproduktion der Aktinomyzeten bei pH 5,0 in Abhängigkeit von der Wachstumsphase (Paardifferenzen zwischen früher [1] und später logarithmischer Wachstumsphase [2] und früher stationärer Wachstumsphase [3])

Paardifferenzen zwischen den Wachstumsphasen	<i>A. odontolyticus</i> cremefarben (n = 3)	<i>A. odontolyticus</i> rot pigmentiert (n = 5)	gesamt (n = 8)	<i>A. naeslundii</i> gesamt (n = 5)
pH 5,0				
1 – 2	0,500	1,000	0,625	n.d.
2 – 3	0,375	0,774	1,000	1,000

p-Wert für Signifikanz $p \leq 0,05$; n.d. = nicht durchgeführt

Nach statistischer Prüfung bildeten die verschieden farbigen Stämme von *A. odontolyticus* gleiche Säuremengen bei pH 5,0. Der anschließende Vergleich mit den Säuremengen der Stämme von *A. naeslundii* ergab ebenso keine signifikanten Unterschiede (Tab. 24 und 25).

Tabelle 24: Säureproduktionen bei pH 5,0 in der logarithmischen Wachstumsphase, am Ende der logarithmischen Wachstumsphase und in der frühen stationären Phase von cremefarbenen und rot pigmentierten Stämmen von *A. odontolyticus* (Mann-Whitney-U-Test)

	cremefarben			<i>A. odontolyticus</i> rot pigmentiert			
	p-Wert	Median	\bar{x}	SD	Median	\bar{x}	SD
Logarithmische Wachstumsphase							
pH 5,0	0,100	12	12	0	32	34	10
Ende der logarithmischen Wachstumsphase							
pH 5,0	0,142	58	53	23	44	43	21
Frühe stationäre Phase							
pH 5,0	0,892	43	37	26	37	42	18

p-Wert für Signifikanz $p \leq 0,05$

Tabelle 25: Säureproduktionen von *A. odontolyticus* und *A. naeslundii* (Mann-Whitney-U-Test) bei pH 5,0 in der logarithmischen Wachstumsphase, am Ende der logarithmischen Wachstumsphase und in der frühen stationären Phase

	<i>A. odontolyticus</i>				<i>A. naeslundii</i>		
	p-Wert	Median	\bar{x}	SD	Median	\bar{x}	SD
Logarithmische Wachstumsphase							
pH 5,0	0,429	24	23	15	34	34	6
Ende der logarithmischen Wachstumsphase							
pH 5,0	0,139	55	48	22	34	36	11
Frühe stationäre Phase							
pH 5,0	0,630	37	40	21	36	38	14

p-Wert für Signifikanz $p \leq 0,05$

5.2.2 Synopse zur Säureproduktion und Säuretoleranz der Aktinomyzeten

Die Säureproduktion der Aktinomyzeten nahm von der logarithmischen Wachstumsphase bis zum Ende der logarithmischen Wachstumsphase zu, erreichte ihr Maximum und fiel dann in der frühen stationären Wachstumsphase wieder ab. Mit Ausnahme des Wachstumsverhaltens von *A. naeslundii* bei pH 5,0 lag die maximale Säureproduktion der Stämme beider Arten immer am Ende ihrer logarithmischen Wachstumsphase (Abb. 19). Innerhalb der konstant gehaltenen pH-Bereiche von pH 8,0, pH 7,0, pH 6,0 und pH 5,0 (Ausnahme *A. naeslundii*) im Meßansatz wurde das gleiche Bild registriert.

Dabei zeigte sich weiterhin, daß sowohl die Stämme von *A. odontolyticus* als auch die von *A. naeslundii* bei pH 7,0 ihr höchstes Säurebildungsvermögen aufwiesen. Bei abfallenden pH-Bereichen von pH 6,0 auf pH 5,0 sanken auch die Säuremengen; selbst im basischen Milieu bei pH 8,0 wurde die maximale Säuremenge nicht überschritten. Insgesamt erwies sich *A. naeslundii* als stärker azidogen als *A. odontolyticus* (Abb. 19).

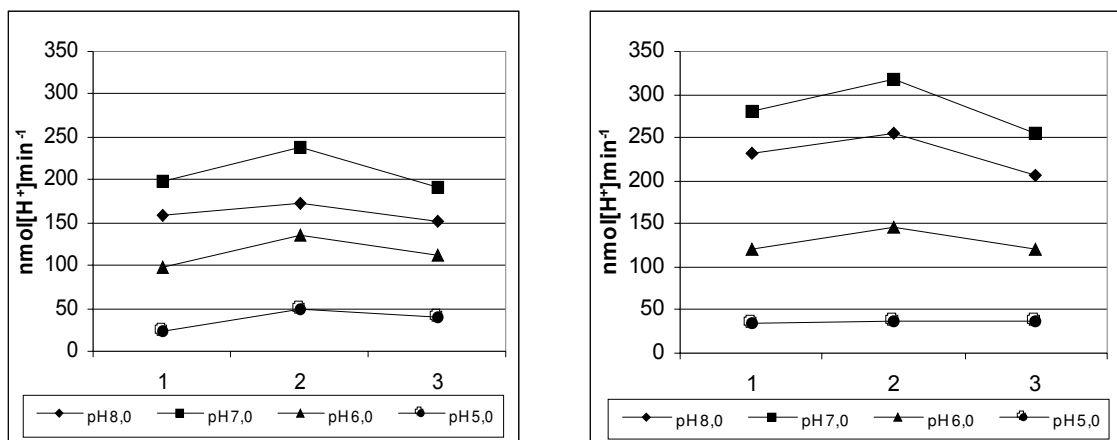


Abbildung 19: Mittlere Säureproduktion von *A. odontolyticus* (n = 8 Stämme, links) und *A. naeslundii* (n = 5 Stämme, rechts) in verschiedenen Wachstumsphasen (1 = logarithmische Wachstumsphase, 2 = späte logarithmische Wachstumsphase, 3 = frühe stationäre Wachstumsphase) und in verschiedenen pH-Bereichen

Die azidurischen Eigenschaften der Stämme lassen sich im Vergleich zur optimalen Säureproduktion bei pH 7,0 auch für die pH-Werte 6,0 und pH 5,0 beschreiben.

In der *logarithmischen Wachstumsphase* lag bei den Stämmen von *A. odontolyticus* bei pH 8,0 eine 80%ige Aktivität vor. Bei pH 6,0 betrug diese 49% und bei pH 5,0 noch 12% im Vergleich zu pH 7,0. Die Stämme von *A. naeslundii* wiesen bei pH 8,0 83% Aktivität auf, während bei pH 6,0 nur 43% und bei pH 5,0 ebenfalls 12% Aktivität

gefunden wurde (Tab. 26).

Am Ende der logarithmischen Wachstumsphase zeigte *A. odontolyticus* bei pH 6,0 noch eine 57%ige Aktivität gemessen an der maximalen Stoffwechselaktivität bei pH 7,0. Bei pH 5,0 lag noch eine 20%ige Aktivität vor. Bei pH 8,0 wurde nicht mehr Säure gebildet als bei pH 7,0. Es wurde nur eine 73%ige Aktivität vorgefunden (Tab. 26).

Anders verhielt sich der Artvertreter der Plaque. *A. naeslundii* produzierte zwar absolut mehr Säure bei den eher neutralen pH-Werten 7,0 und 8,0 (81%), zeigte aber bei den niedrigeren pH-Werten von pH 6,0 und pH 5,0 eine geringere prozentuale Aktivität als die Stämme von *A. odontolyticus*. Es lag nur noch eine 46%ige und 11%ige Säureproduktion vor (Tab. 26).

In der frühen stationären Wachstumsphase änderte sich das Bild nur geringfügig. Die Stämme von *A. odontolyticus* steigerten sich bei pH 8,0 von einer 73%igen auf eine 80%ige Aktivität. Auch bei pH 6,0 und pH 5,0 nahmen die Aktivitäten dieser Stämme leicht zu. Sie waren zu 59 bzw. 21% aktiv. Bei den Stämmen von *A. naeslundii* war ein geringerer Anstieg als bei den Stämmen von *A. odontolyticus* zu verzeichnen. Die pH-Werte pH 8,0, pH 6,0 und pH 5,0 führten zu einer 81%igen, 48%igen bzw. 15%igen Aktivität im Vergleich zu pH 7,0 (Tab. 26).

Zusammenfassend verhielt sich *A. naeslundii* einerseits als stärker azidogen als *A. odontolyticus*, der aber andererseits *A. naeslundii* in seinen azidurischen Eigenschaften überlegen war.

Tabelle 26: Säuretoleranz der Aktinomyzeten in den verschiedenen Wachstumsphasen

Säureproduktion (nmol[H ⁺]min ⁻¹) und Säuretoleranz (%)				
	pH 8,0	pH 7,0	pH 6,0	pH 5,0
Logarithmische Wachstumsphase				
<i>A. odontolyticus</i>				
cremefarben (n = 3)	116 59%	196 100%	74 38%	12 6%
rot pigmentiert (n = 5)	183 92%	199 100%	108 54%	34 17%
gesamt (n = 8)	158 80%	198 100%	97 49%	23 12%
<i>A. naeslundii</i>				
gesamt (n = 5)	232 83%	281 100%	120 43%	34 12%
Ende der logarithmischen Wachstumsphase				
<i>A. odontolyticus</i>				
cremefarben (n = 3)	156 64%	245 100%	134 55%	53 22%
rot pigmentiert (n = 5)	191 83%	229 100%	137 56%	43 18%
gesamt (n = 8)	173 73%	237 100%	135 57%	48 20%
<i>A. naeslundii</i>				
gesamt (n = 5)	256 81%	318 100%	147 46%	36 11%
Frühe stationäre Wachstumsphase				
<i>A. odontolyticus</i>				
cremefarben (n = 3)	136 71%	191 100%	106 55%	37 19%
rot pigmentiert (n = 5)	162 85%	191 100%	116 61%	42 22%
gesamt (n = 8)	152 80%	191 100%	113 59%	40 21%
<i>A. naeslundii</i>				
gesamt (n = 5)	207 81%	254 100%	121 48%	38 15%

6 Diskussion

Nach bisherigen Untersuchungen wird den Aktinomyzeten eine Bedeutung bei der Auslösung und Progression der Wurzelkaries (Syed et al., 1975; Ellen et al., 1985; Bowden et al., 1990) und Gingivitis eingeräumt (Loesche und Syed, 1978; Moore et al., 1982, 1984). *A. viscosus*, der 1990 von Johnson et al. als Serotyp 2 von *A. naeslundii* reklassifiziert wurde, und *A. naeslundii* wurden in diesem Zusammenhang am häufigsten aufgefunden. Boyar und Bowden (1985) stellten dagegen *A. odontolyticus*, der 1958 von Batty aus kariösem Dentin isoliert und beschrieben wurde, in enge Beziehung zur Progression initialer Milchzahnkaries.

Um die odontopathogene Wirkung der Aktinomyzeten zu untermauern, sollten in der vorliegenden Untersuchung Stämme von *A. naeslundii* und *A. odontolyticus*, die einer repräsentativen Sammlung oraler Keime entstammten, hinsichtlich ihrer Säureproduktion und Säuretoleranz untersucht werden. 60 Kinder und Jugendliche waren über vier Jahre in einer Kariesrisikostudie begleitet worden, und während klinisch-mikrobiologischer Kontrolluntersuchungen wurden neben Mutans-Streptokokken und Laktobazillen auch Aktinomyzeten aus der Plaque und dem Speichel der Studienteilnehmer isoliert und konserviert (Kneist et al., 1998; Stöber, 1998; Stöber et al., 2000). Die gewonnenen Mutans-Streptokokken und Laktobazillen wurden bereits hinsichtlich ihrer Säureproduktion und Säuretoleranz in Anlehnung an die pH-state-Technik von Birkhed (1978) untersucht (Kneist et al., 1999; Bergholz, 2002; Baake, 2003). Dabei konnte Bergholz (2002) zeigen, daß Mutans-Streptokokken im kritischen pH-Bereich von pH 5,5 (Stephan, 1944) immer noch eine 30 bis 40%ige Säureproduktion – gemessen an ihrer maximalen Säureproduktion – aufweisen, lebensfähig bleiben und somit zur Demineralisation der Zahnhartgewebe beitragen können. Im Sinne der spezifischen Plaquehypothese konnte Bergholz (2002) darüber hinaus nachweisen, daß Mutans-Streptokokken von kariesaktiven Kindern im kritischen pH-Bereich signifikant mehr Säure aus Glukose produzieren als Stämme von kariesinaktiven Kindern. Im Vergleich zu den Mutans-Streptokokken konnte Baake (2003) für die am häufigsten im Speichel nachgewiesenen Laktobazillen eine noch höhere Säuretoleranz herausstellen. Kneist et al. (1998) konnten in der Standortflora der Plaque und des Speichels der Studienteilnehmer der Erfurter Kariesrisikostudie auch den Aktinomyzeten einen Stellenwert einräumen. *A. naeslundii* wurde als Standortkeim der Plaque erkannt und *A. odontolyticus* als Speichelkeim (Tab. 27). Somit bot es sich an, auch der

Säureproduktion und Säuretoleranz der beiden Aktinomyzetenarten *in vitro* nachzugehen, um im Sinne der unspezifischen Plaquehypothese ihren potentiellen Beitrag für die pH-Senkung in Plaque und Speichel zu diskutieren. Immerhin standen dafür auch die Studienprotokolle zur Zusammensetzung der Plaque- und Speichelflora aller Studienteilnehmer zur Verfügung.

Tabelle 27: Standortflora von Plaque und Speichel bei Kindern und Jugendlichen im Studienzeitraum über vier Jahre

Plaque 34/35	Speichel
<i>A. naeslundii</i>	<i>A. odontolyticus</i>
<i>S. sanguinis</i>	<i>S. salivarius</i>
<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>
<i>S. sobrinus</i>	<i>S. sobrinus</i>
	<i>L. paracasei ss paracasei</i>
	<i>L. paracasei ss tolerans</i>
	<i>L. rhamnosus</i>

In einer Studie an gnotobiotischen Ratten wurde bereits der Rolle verschiedener Aktinomyzetenstämme bei der Plaquebildung nachgegangen und ihre Kariogenität untersucht. Dabei zeigte sich, daß alle Stämme die Fissuren und zum Teil die lingualen Zahnflächen kolonisierten und damit Plaque produzierten. Die Stämme von *A. viscosus* bzw. *A. naeslundii* erwiesen sich als kariogen (Fissurenkaries), während sich alle Stämme von *A. odontolyticus* als nicht kariogen erwiesen, also bei den Versuchstieren keine Karies auslösen konnten (Shakespeare et al., 1985). Die Bedeutung von *A. odontolyticus* könnte jedoch in der Kariesprogression liegen. Immerhin hatte Batty (1958) *A. odontolyticus* aus kariösem Dentin isoliert, obwohl er ein Speichelkeim ist. *A. odontolyticus* erwies sich in den vorliegenden Untersuchungen als weniger azidogen im Vergleich zu *A. naeslundii*, zeigte aber eine ausgeprägtere Säuretoleranz (Abb. 19, Tab. 26). In Übereinstimmung zu den Ergebnissen von Shakespeare et al. (1985) kann *A. naeslundii* als Erstbesiedler in der Plaque ein kariogenes Milieu fördern und verliert bei Kariesprogression durch seine geringere Säuretoleranz an Bedeutung. Dagegen kann der Speichelkeim *A. odontolyticus* in kariösen Kavitäten durch seine höhere Säuretoleranz erst an Bedeutung gewinnen.

Speichelkeime, die an den Zahnglattflächen nicht haften bzw. kolonisieren können, dürften besonders in der unversorgten Kavität eine ökologische Nische finden und dann zur kariösen Progression beitragen, wenn sie sowohl azidogene als auch azidurische

Eigenschaften aufweisen. Für Laktobazillen konnten Kneist et al. (1998) diesen Zusammenhang untermauern; Kinder mit behandlungsbedürftigen Zähnen wiesen um etwa 20 Prozentpunkte höhere Laktobazillenzahlen im Speichel auf als sanierte Kinder. Die Autoren konnten zuvor auch nachweisen, daß Laktobazillen im kariös erweichten Dentin dominieren und durch Exkavation des kariösen Dentins eliminiert werden (Heinrich und Kneist, 1988; Kneist et al., 1989, Heinrich et al. 1991). Die Pulpa von 70% der behandelten profund zerstörten Milchmolaren waren darüber hinaus ein Jahr nach der Therapie entzündungsfrei. Lag histologisch noch eine Pulpainflammation vor, so waren am Kavitätenboden Laktobazillen und/oder Mutans-Streptokokken nachgewiesen worden. Kamen Aktinomyzeten vor, war die Pulpa immer entzündungsfrei (Heinrich et al., 1991) (Abb. 20).

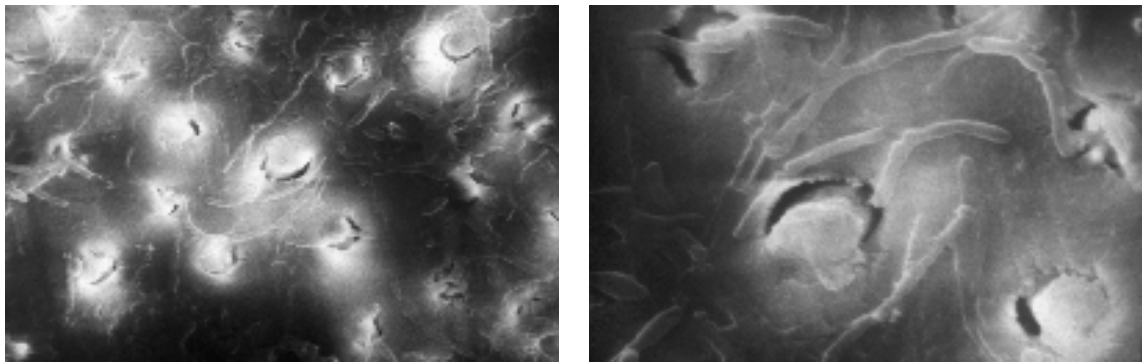


Abbildung 20: Wachstum von *Actinomyces viscosus* OMZ 105 auf präparierten Dentinoberflächen im rasterelektronenmikroskopischen Bild (links). Schleifstaubpfropfen können die Invasion von *A. viscosus* OMZ 105 in die Dentintubuli nicht verhindern (rechts) (Heinrich und Kneist, 1987)

An gnotobiotischen Ratten konnten Stößer et al. (1989a) und Kneist et al. (1990) mit Mutans-Streptokokken und Aktinomyzeten einen unterschiedlich hohen Wurzelkariesbefall nach Gingivektomie auslösen. Tiere, die mit *A. viscosus* OMZ 105 infiziert waren, entwickelten den höchsten Kariesbefall; der Wurzelkariesbefall der mit *S. sobrinus* OMZ 176 und *A. viscosus* OMZ 105 infizierten Tiere lag signifikant niedriger, und mit *S. sobrinus* OMZ 176 allein konnte überhaupt keine Wurzelkaries bei den Versuchstieren ausgelöst werden (Abb. 2). Eine gleiche Beobachtung hatten Firestone et al. (1989) an gingivektomierten Ratten mit kariogener Diät gemacht. In ihrem Versuch war *A. viscosus* M-100 signifikant stärker kariogen als *S. sobrinus* 6715. Die gemeinsame Inokulation steigerte die Kariesinzidenz nicht. *A. naeslundii* konnte in diesen und auch anderen Tierstudien Karies auslösen, während *A. odontolyticus* allein keine Rolle bei der Kariesinitiation nachgewiesen werden konnte.

Bei den Kindern der Kariesrisikostudie lag die Keimzahl der Approximalplaque in einer Größenordnung von $>10^6$ CFU pro dental-floss vor; Aktinomyzeten kamen mit einer Prävalenz von 42 bis 65% vor. *A. naeslundii* war in nahezu allen Fällen mit einer durchschnittlichen Prävalenz von 36,2% nachweisbar und dominierte sogar in etwa der Hälfte der Fälle. Die Prävalenz von *A. odontolyticus* lag hingegen nur bei 1,4%. Streptokokken besiedelten zu etwa 20% die approximalen Zahnflächen, und die Prävalenz der Mutans-Streptokokken betrug 4,0%. *S. sanguinis* kolonisierte nahezu regelmäßig die Zahnflächen der Studienteilnehmer (Tab. 27, Anhang Tab. 4 und 5). Damit bestätigten Kneist et al. (1998) ein komplexes und charakteristisches Keimspektrum, das das von anderen Autoren selektiert in Teilstudien aufgefundene Keimspektrum bestätigte.

So dominieren auch nach Boyd und Williams (1971), Boue et al. (1987) und Fure et al. (1987) Aktinomyzeten in der Plaque und bieten mit ihrer enormen Oberfläche anderen Mikroorganismen die Möglichkeit des Attachments. Angaben zur Prävalenz in der Plaque werden im Schrifttum mit bis zu 40% angegeben (Loesche et al., 1972; Ellen et al., 1985; Brown et al., 1986; Nyvad und Fejerskov, 1989). Als bevorzugter Standort gilt der Approximalraum (Marsh und Martin, 1992).

Die Speichelkeimzahl der Kinder und Jugendlichen lag bei 10^{7-8} CFU pro ml. Die Prävalenz der Aktinomyzeten lag im Vergleich zur Plaque nur bei 20%; Streptokokken erwiesen sich im Mittel mit etwa 40% deutlich erhöht. Im Vergleich zur Plaque wurde *A. odontolyticus* mit 5,6%iger Prävalenz häufiger isoliert und erwies sich als dominanter Artvertreter. *A. naeslundii* kam mit einer Prävalenz von 7,7% im Speichel vor. Die Isolationsfrequenz und Prävalenz von Mutans-Streptokokken war im komplexen Keimspektrum unauffällig bzw. different, denn nur bei Kindern mit hohem Kariesbefall kamen Mutans-Streptokokken im Mittel mit einer Prävalenz von 5,6% im komplexen Keimspektrum des Speichels vor. Die durchschnittliche Prävalenz der Mutans-Streptokokken aller Kinder und Jugendlichen lag bei 2,6% (Tab. 27, Anhang Tab. 6 und 7).

Unter den von den Studienteilnehmern zur Basisuntersuchung gewonnenen 416 Aktinomyzeten handelte es sich in zwei Drittel der Stämme um *A. naeslundii* und bei einem Zehntel um *A. odontolyticus*. Wiederum zwei Drittel der Stämme von *A. odontolyticus* imponierten auf Hirn-Herz-Blutagar rot pigmentiert und das übrige Drittel cremefarben (Abb. 4). Unabhängig von der Pigmentierung wiesen die Stämme

von *A. odontolyticus* gleiche wachstumskinetische Parameter auf und waren auch in ihrer Säureproduktion und -toleranz nahezu identisch, so daß sie zusammengefaßt werden konnten. Insgesamt lassen sich die größeren Standardabweichungen durch ihr myzelartiges Wachstum erklären (Tab. 5 und 6); dies steht in Übereinstimmung zu de Jong et al. (1984), die bei Streptokokken ein nahezu identisches Wachstum reproduzieren konnten während dies bei *A. viscosus* nur schwer gelang.

In Übereinstimmung zu Kalfas et al. (1990) und Takahashi und Yamada (1999) zeigten die fünf Stämme von *A. naeslundii* ihre höchste Glykolyserate bei pH 7,0, die mit fallendem pH-Wert abnahm. Das gleiche Verhalten konnte auch für die acht Stämme von *A. odontolyticus* nachgewiesen werden (Abb. 19, Tab. 26). Im Gegensatz dazu beschrieben Harper und Loesche (1984) für *A. viscosus* Stamm-Nr. 21 eine maximale Säureproduktion bei pH 4,5; die Autoren hatten die Säureproduktion über 30 Minuten registriert. In den ersten beiden Minuten lag die höchste Säuremenge bei pH 5,0 und pH 6,5 vor (Harper und Loesche, 1984). In der vorliegenden Studie wurde die Säureproduktion über vier Minuten bestimmt, so daß unter Zugrundelegung vergleichbarer Meßzeiten durchaus eine Übereinstimmung zu den Befunden von Harper und Loesche (1984) vorliegen könnte.

Weiterhin produzierten die Stämme von *A. naeslundii* im pH-Optimum (pH 7,0) und bei pH 8,0 unter standardisierten In-vitro-Bedingungen mehr Säure als die Stämme von *A. odontolyticus*. Dieser Unterschied hob sich bei den niedrigeren pH-Werten auf, bei denen sich *A. odontolyticus* im Vergleich zu *A. naeslundii* als deutlich säuretolanter erwies (Abb. 19, Tab. 26). Dies könnte auch eine Erklärung dafür sein, warum Batty (1958) mehrheitlich Stämme von *A. odontolyticus* aus tief kariös zerstörtem Dentin isolierte.

Werden die Aktinomyzeten in ihrer Säureproduktion und -toleranz mit den Mutans-Streptokokken (Kneist et al., 1999; Bergholz, 2002) und Laktobazillen (Baake, 2003) der gleichen Kinder und Jugendlichen verglichen, so erwiesen sich die Laktobazillen als die stoffwechselaktivsten (Tab. 28). Laktobazillen produzierten nicht nur bei pH 7,0 die größte Säuremenge sondern hatten auch im sauren pH-Bereich die ausgeprägteste Säuretoleranz; bei pH 5,0 zeichneten sich die Stämme immerhin noch mit einer mindestens 40%igen Aktivität aus, und bei pH 5,5 lag sie sogar noch über 54%.

Nahezu gleich viel Säure produzierten die Stämme von *S. mutans* bei pH 7,0, deren Säuretoleranz jedoch deutlich unter der der Laktobazillen lag. Bei pH 5,0 zeigten sie nur

Tabelle 28: Vergleich der Säureproduktionen (Säuremenge pro mg Bakterientrockengewicht, nmol $[H^+]$ min⁻¹mg⁻¹TG) von *S. mutans* (SM) Laktobazillen und Aktinomyzeten sowie der Säuretoleranz (Säuremenge bei verschiedenen pH-Werten im Vergleich zur maximalen Säureproduktion bei pH 7,0; in Klammern in Prozent)

Stämme	Anzahl	Säureproduktion (nmol $[H^+]$ min ⁻¹ mg ⁻¹ TG)				
		pH 8,0	pH 7,0	pH 6,0	pH 5,5	pH 5,0
SM-Stämme primär gesunder Kinder	9	n.d.	290	193 (67%)	125 (43%)	70 (24%)
SM-Stämme von Kindern mit hohem Kariesbefall	11	n.d.	262	162 (62%)	108 (41%)	58 (22%)
SM-Stämme von Kindern mit unterschiedlichem Kariesbefall (Bergholz, 2002)	5	n.d.	272	133 (49%)	76 (28%)	41 (15%)
<i>L. paracasei</i> ss <i>paracasei</i>	8	n.d.	226	n.d.	126 (56%)	95 (42%)
<i>L. paracasei</i> ss <i>tolerans</i>	6	n.d.	292	n.d.	157 (54%)	121 (41%)
<i>L. rhannosus</i>	7	n.d.	226	n.d.	122 (54%)	90 (40%)
<i>L. delbrueckii</i> ss <i>lactis</i> (Baake, 2003)	2	n.d.	313	n.d.	178 (57%)	132 (42%)
<i>A. odontolyticus</i> (creme)	3	43 (64%)	67	37 (55%)	n.d.	15 (22%)
<i>A. odontolyticus</i> (rot)	5	52 (83%)	63	37 (60%)	n.d.	12 (19%)
<i>A. odontolyticus</i> (gesamt)	8	47 (73%)	65	37 (57%)	n.d.	13 (20%)
<i>A. naeslundii</i>	5	59 (81%)	74	34 (46%)	n.d.	8 (11%)

n.d.= nicht durchgeführt

noch eine 15- bis 24%ige Aktivität, bei pH 5,5 lag sie zwischen 28 und 43% der maximalen Säureproduktion und bei pH 6,0 zwischen 49 und 67%. Allerdings sind die Mutans-Streptokokken in der Plaque und die Laktobazillen im Speichel „zu Hause“.

Die Aktinomyzeten produzierten in allen pH-Bereichen deutlich weniger Säure, wobei sich Stämme von *A. odontolyticus* als weniger azidogen erwiesen als Stämme von *A. naeslundii*. Wie *S. mutans* hatte *A. odontolyticus* bei pH 5,0 eine 20%ige und bei pH 6,0 eine 57%ige Aktivität. Stämme von *A. naeslundii* waren hingegen mit 11- und 46%iger Säureproduktion weniger azidurisch (Tab. 28).

Wird die Säuremenge der Mutans-Streptokokken und Aktinomyzeten pro Milligramm Trockengewicht als Basis genommen und mit dem prozentualen Vorkommen der Keime in der Plaque und im Speichel multipliziert, so wird der relative Anteil der Keime an der Säureproduktion in der Plaque bzw. im Speichel hypothetisch verdeutlicht (Abb. 21, Anhang Tab. 4 bis 7). Diese Berechnungen konnten vorgenommen werden, weil das prozentuale Vorkommen der Keime in der Approximalplaque und aus dem Speichel komplex auf Hirn-Herz-Blutagar für jeden der 60 Studienteilnehmer erfaßt wurde und den vorliegenden Protokollen entnommen werden konnte. Die durch Baake (2003) untersuchten Laktobazillen wurden in einer Substichprobe der Studienteilnehmer parallel von Rogosaagar isoliert, so daß sie in diese Auswertung nicht einbezogen werden konnten. Im komplexen Keimspektrum auf Hirn-Herz-Blutagar spielten Laktobazillen eine untergeordnete Rolle.

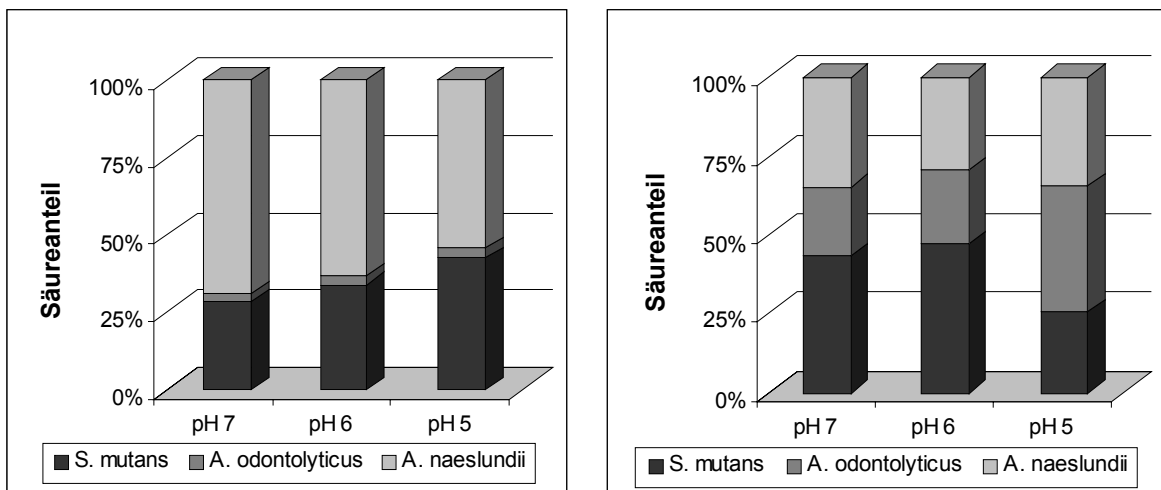


Abbildung 21: Säuremenge der Mutans-Streptokokken und Aktinomyzeten pro Milligramm Trockengewicht multipliziert mit dem prozentualen Vorkommen der Keime in der Plaque (links) und im Speichel (rechts)

Bei einem pH-Wert von pH 7,0 in der Plaque würde *A. naeslundii* mit einem Säureanteil von 2679 nmol $[H^+]$ zum Säuregehalt in der Plaque beitragen. Der Anteil der Mutans-

Streptokokken würde bei 1100 nmol $[H^+]$ liegen und der von *A. odontolyticus* bei 91 nmol $[H^+]$. Bei pH 6,0 würde der Säureanteil von *A. naeslundii* mit 1231 nmol $[H^+]$ immer noch deutlich über dem der Mutans-Streptokokken (652 nmol $[H^+]$) und von *A. odontolyticus* (52 nmol $[H^+]$) liegen. Bei einem pH-Wert von pH 5,0 sinkt der Säureanteil der Aktinomyzeten drastisch (*A. naeslundii* 290 nmol $[H^+]$, *A. odontolyticus* 18 nmol $[H^+]$) und der der Mutans-Streptokokken liegt mit 224 nmol $[H^+]$ etwa in der gleichen Größenordnung. Mit sinkendem pH-Wert in der Plaque nehmen die Säureanteile der Aktinomyzeten ab und die der Mutans-Streptokokken gegenläufig zu. *A. odontolyticus* spielt als Standortkeim des Speichels nur eine unbedeutende Rolle in der Plaque (Abb. 21 links). Umgekehrt gewinnt *A. odontolyticus* im Speichel bei sinkendem pH-Wert an Bedeutung (Abb. 21 rechts; pH 7,0: 364 nmol $[H^+]$, pH 6,0: 207 nmol $[H^+]$, pH 5,0: 73 nmol $[H^+]$). Sein Anteil am Säuregehalt des Speichels liegt wegen seines deutlich höheren Vorkommens auch höher als in der Plaque. Den größten Anteil am Säuregehalt im Speichel dürfte den Laktobazillen zukommen, die in diese Berechnung nicht einbezogen werden konnten. Laktobazillen, die wie schon angeführt nicht an Zahnglattflächen haften können, finden erst wieder in der kariösen Kavität eine ökologische Nische und tragen zur schnellen Progression der Karies bei. Gleiches dürfte für *A. odontolyticus* gelten.

Aufgrund der Höhe ihres Vorkommens im Speichel würde der Säureanteil der Mutans-Streptokokken über dem von *A. naeslundii* liegen (Mutans-Streptokokken: pH 7,0 715 nmol $[H^+]$, pH 6,0 424 nmol $[H^+]$, pH 5,0 46 nmol $[H^+]$; *A. naeslundii*: pH 7,0 570 nmol $[H^+]$, pH 6,0 262 nmol $[H^+]$, pH 5,0 62 nmol $[H^+]$).

Abbildung 22 zeigt den Säureanteil, den *S. mutans*, *A. naeslundii* und *A. odontolyticus* in Plaque und Speichel hätten, wenn die Studienteilnehmer gruppenbezogen betrachtet würden (Anhang Tab. 4 bis 7). In die Kariesrisikostudie waren kariesfreie (dmft/DMFT = 0) Erstkläßler (Jg. 1984/85) und Fünftkläßler (Jg. 1980/81) mit niedrigem Kariesrisiko eingebunden, Kinder mit epidemiologisch mittlerem Kariesbefall (dmft/DMFT < 3 [Jg. 1984/85] bzw. < 5 [Jg. 1980/81]) und mittlerem Kariesrisiko sowie Kinder mit epidemiologisch hohem Kariesbefall (dmft/DMFT ≥ 3 [Jg. 1984/85] bzw. ≥ 5 [Jg. 1980/81]) und entsprechend hohem Kariesrisiko (Stöber et al., 1998).

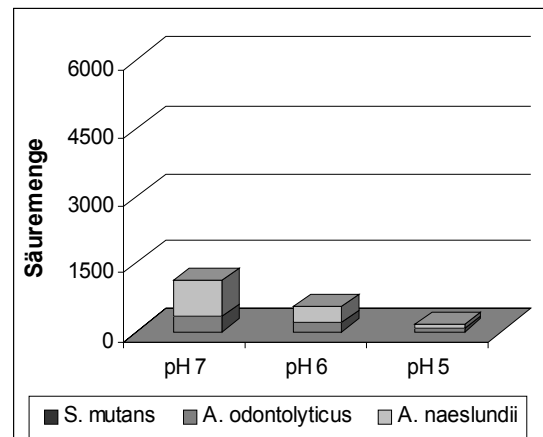
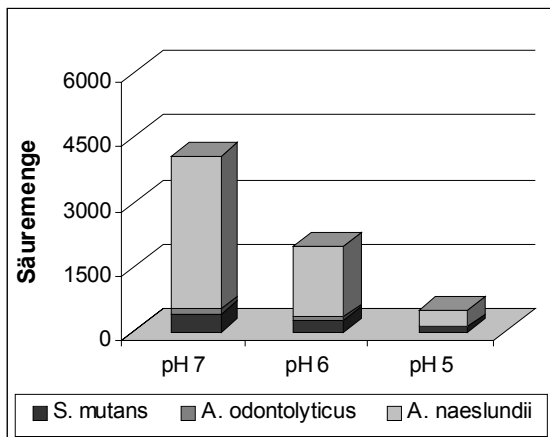
Mit zunehmendem Kariesrisiko stieg das Vorkommen der Mutans-Streptokokken sowohl in der Plaque als auch im Speichel an. Diese Tendenz war bei den

Aktinomyzeten nicht so deutlich. *A. odontolyticus* schwankte in seinem Vorkommen in der Plaque zwischen 1,1% und 1,7% und im Speichel zwischen 2,7% und 8,6%. *A. naeslundii* lag in der Plaque mit 24,4% bis 48,2% vor und im Speichel nur zwischen 6,5% und 10,5% (Anhang Tab. 4 bis 7).

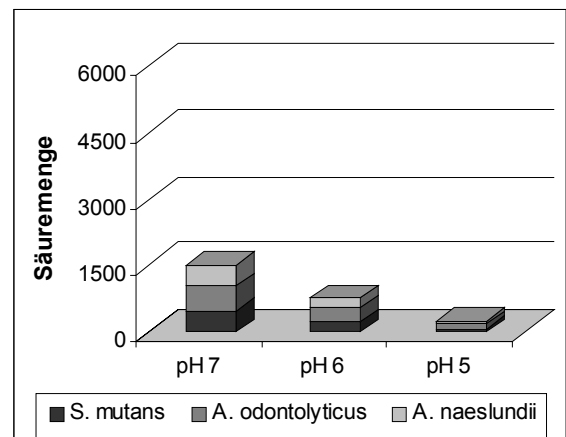
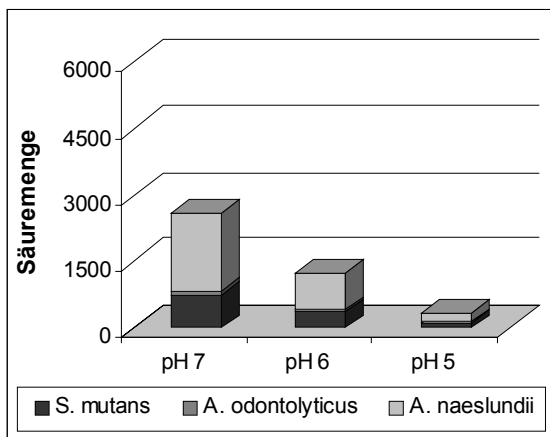
Aus Abbildung 22 ist ersichtlich, daß bei den kariesfreien Kindern mit niedrigem Kariesrisiko die hypothetische Säuremenge in der Plaque mehrheitlich von *A. naeslundii* produziert würde. Die Säuremenge der Mutans-Streptokokken wäre deutlich geringer als die der Aktinomyzeten; im Speichel trugen Mutans-Streptokokken nicht zur Säureproduktion bei, da sie in der Basisuntersuchung der Kinder und Jugendlichen auch nicht im Speichel nachgewiesen werden konnten. Bei fallendem pH-Wert in der Plaque nähme der Anteil der durch Aktinomyzeten produzierten Säure deutlich ab; freilich kommen die kariesfreien Kinder bei ihrem niedrigen Kariesrisiko kaum in diese Situation. Aktinomyzeten bilden neben Milchsäure darüber hinaus die weniger aggressiven Säuren wie Essigsäure, Ameisensäure und Bernsteinsäure.

Bei den Kindern und Jugendlichen mit mittlerem Kariesbefall und mittlerem Kariesrisiko steigt der durch Mutans-Streptokokken gebildete Säureanteil an; Aktinomyzeten sind aufgrund ihrer hohen Prävalenz aber immer noch diejenigen, die in Plaque und Speichel am stärksten zur Säuremenge beitragen. Im sauren pH-Bereich im Zahnbelag würden Aktinomyzeten nur noch geringfügig mehr Säure produzieren als die Mutans-Streptokokken, wobei die Aktinomyzeten weniger säuretolerant sind und demzufolge auch an Biomasse verlieren würden. Im Speichel würden Mutans-Streptokokken, *A. naeslundii* und *A. odontolyticus* zu etwa gleichen Teilen in allen pH-Bereichen ihre Säuren produzieren.

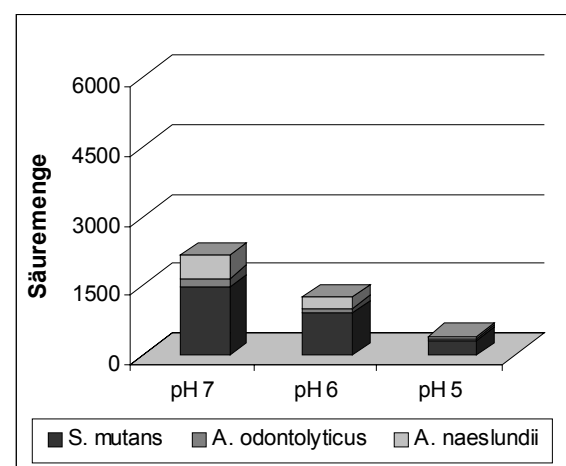
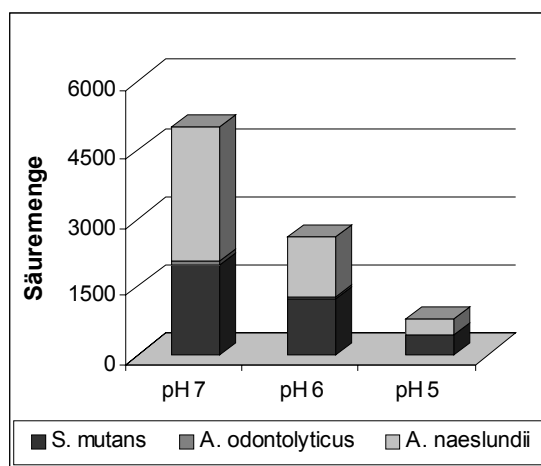
Daß die Säureproduktion ein bedeutsamer Virulenzfaktor ist, wird bei den Kindern mit hohem Kariesbefall und hohem Kariesrisiko deutlich. Zunächst liegt die Säuremenge, die bei pH 7,0 in der Plaque entstehen würde, weit über der Menge der Kinder mit mittlerem und niedrigem Kariesrisiko. Der Anteil der durch Mutans-Streptokokken homofermentativ gebildeten Säure wäre auch drastisch angestiegen, so daß die Zahnhartgewebe mehr der Milchsäure ausgesetzt werden würden als den weniger aggressiven Säuren der Aktinomyzeten. Auch bei sinkendem pH-Milieu bleiben die Mutans-Streptokokken die Hauptproduzenten der Säure. Bei pH 5,0 produziert *A. naeslundii* noch mehr Säure in der Plaque als *A. odontolyticus*, und im Speichel



Niedriges Kariesrisiko



Mittleres Kariesrisiko



Hohes Kariesrisiko

Abbildung 22: Mittlere Säuremenge ($\text{nmol}[\text{H}^+]\text{min}^{-1}$) der Mutans-Streptokokken und Aktinomyzeten pro Milligramm Trockengewicht multipliziert mit dem prozentualen Vorkommen der Keime in der Plaque (links) und im Speichel (rechts) bei Probanden mit niedrigem, mittlerem und hohem Kariesrisiko

würden beide nur noch zu einem kleinen Anteil die Säureproduktion steigern. Generell haben die Kinder mit einem hohen Kariesrisiko auch mehr durch Mutans-Streptokokken gebildete Säuren im Speichel als die Kinder mit mittlerem bzw. niedrigem Kariesrisiko. Da die Laktobazillen als starke Säureproduzenten in die vorliegende Bewertung nicht einbezogen werden konnten, dürfte das allgemeine Säurepotential vermutlich noch höher liegen. Ein Indiz dafür ist der signifikant niedrigere pH-Wert im Ruhespeichel von Kindern mit hohen Laktobazillenzahlen im Speichel im Vergleich zu den Altersgefährten mit niedrigen Laktobazillenzahlen während der 1. Wiederholungsuntersuchung der Kinder (X^2 -Test $p = 0,04$) (Baake, 2003).

Die Abbildung 22 veranschaulicht, daß Aktinomyzeten in der Mundhöhle an verschiedenen Standorten unterschiedlich zur Säuremenge beitragen können und dies auch in niedrigen pH-Bereichen. Freilich produzieren Aktinomyzeten im Vergleich zu Mutans-Streptokokken nicht nur Laktat (Schaal, 1986); für letztere konnten Stößer et al. (1989b) eine überwiegende Milchsäureproduktion nachweisen.

Nach Ellen und Onose (1978) reicht die Säureproduktion der Aktinomyzeten aber aus, um den pH-Wert lokal zu senken. Die hauptsächlichen sauren Endprodukte des Kohlenhydratmetabolismus der fermentativen Aktinomyzeten sind Bernsteinsäure und Milchsäure sowie geringere Mengen an Essigsäure und Ameisensäure (Schaal, 1986; Buchanan und Pine, 1967). Distler et al. (1992) bestätigten Milchsäure als Stoffwechselhauptprodukt von *A. viscosus* (heute *A. naeslundii*, vgl. Kap. 2.2) bei Glukoseüberschuß, während bei Glukoselimitation Ameisensäure, Essigsäure, Bernsteinsäure zunehmen und Milchsäure abnimmt. Bei Glukoseüberschuß war die metabolische Aktivität der Stämme nach Distler et al. (1992) größer, wohingegen bei Glukoselimitation die Stämme mehr Wachstum zeigten. Die Anreicherung von Laktat beeinflusst letztlich den pH-Wert des Zahnbelags und führt zur Demineralisation der Zahnhartgewebe.

Takahashi und Yamada (1999) konnten bei *A. naeslundii* hauptsächlich Laktat als Endprodukte des anaeroben Glukosemetabolismus bei Abwesenheit von Bikarbonat bestimmen, während unter Bikarbonatanwesenheit die Säureproduktion mit Formiat, Azetat, Sukzinat und Laktat auf das 1,8- bis 2,5fache anstieg. Unter aeroben Bedingungen produzierte *A. naeslundii* aus Glukose unter O_2 -Verbrauch hauptsächlich Essigsäure. Die gleichen Autoren gingen weiterhin dem Laktatmetabolismus nach. Die Stämme bildeten unter Sauerstoffverbrauch aus Laktat Basen; bei pH 5,5 lag der

Sauerstoffverbrauch und die Basenproduktion am höchsten. Die Endprodukte waren Azetat und Pyruvat. Vermutlich wurde in der vorliegenden Studie durch die Aktinomyzeten aus der Glukose auch hauptsächlich Azetat gebildet, denn die Messungen erfolgten unter aeroben Bedingungen (Abb. 10 und 11).

Nach Komiyama und Khandelwal (1992) sind Aktinomyzeten aus kariösen Läsionen virulenter als Stämme von gesunden Wurzeloberflächen. So bildeten Stämme von *A. viscosus* aus kariösem Wurzelentin in der gleichen Zeiteinheit dreimal soviel Glykogen aus Glukose im Vergleich zu Stämmen von kariesfreien Wurzeloberflächen. Die nachfolgende Säureproduktion dauerte länger und war auch während der Glykogensynthese stärker bei den aus kariösem Wurzelentin isolierten Stämmen. Zuvor hatten Komiyama et al. (1988) schon festgestellt, daß es Unterschiede zwischen Stämmen von *A. viscosus* in ihrer Glykolyserate und im pH-Optimum des Glykogenmetabolismus gibt. Auch unter den in der vorliegenden Studie untersuchten Aktinomyzeten wichen zwei Stämme - *A. odontolyticus* W55/1007 und *A. naeslundii* W54/981 – in ihrer Glykolyserate innerhalb der Art ab (Tab. 7, 11, 15, 19; Anhang Tab. 1 bis 3). Kalfas et al. (1990) registrierten in diesem Zusammenhang bei Aktinomyzeten im Vergleich zu Mutans-Streptokokken und Laktobazillen eine hohe endogene Aktivität vor Glukosezugabe in den Messansatz, die sich durch das Vorhandensein von Glykogen als intrazelluläres Polysaccharid erklären ließe. Zero et al. (1986) hatten lediglich bei *A. viscosus* eine endogene Aktivität bei 2 bzw. 0,05% Glukose im Medium beobachtet; die ebenso untersuchten Streptokokken wiesen nur bei 2%iger Glukosezugabe eine endogene Aktivität auf. Ähnliche Beobachtungen wurden auch in der vorliegenden Arbeit gemacht. Schon vor der Zugabe der Glukose in das Reaktionsgefäß fiel der pH der auf pH 7,0 eingestellten und relativ „ausgehungerten“ Bakteriensuspension sehr schnell unter diese pH-Grenze (pH 6,9). Erst nach etwa zweiminütiger Titration nach Glukosezugabe stieg der Basenverbrauch der Titrieranlage und damit die Säureproduktion langsamer als zuvor. Dieses Verhalten fiel besonders bei pH 7,0 und pH 8,0 auf. Ein möglicher kompletter Glukoseverbrauch in den ersten beiden Minuten konnte ausgeschlossen werden.

Das Optimum der Glukosefermentation von *A. viscosus* lag bei Harper und Loesche (1984) bei pH 4,5; wie schon angeführt hatten die Autoren die Säureproduktion über 30 Minuten hinweg bestimmt. Nach eigenen Voruntersuchungen wurde mit einer optimalen Säureproduktion bei pH 8,0 gerechnet. Wider Erwarten lag das Optimum

jedoch bei pH 7,0 bei beiden untersuchten Aktinomyzetenarten. Nur zwei Stämme (W26/386, R3/35) bildeten bei pH 8,0 (Tab. 7 und 11) die größte Säuremenge. Gleichzeitig fiel bei diesen Stämmen eine geringere endogene Aktivität auf. Kalfas empfahl nach dreimaligem Waschen des Bakteriensediments, die Biomasse vor der Titration durch ein einstündiges Bebrüten in Puffer „auszuhungern“, um auch die endogene Aktivität als Störfaktor auszuschließen (Kalfas, persönliche Mitteilung 2002). Möglicherweise würde das pH-Optimum dann für die Aktinomyzeten bei pH 8,0 liegen. In der vorliegenden Untersuchung sollte andererseits das methodische Vorgehen von Bergholz (2002) und Baake (2003) eingehalten werden, um die Vergleichbarkeit der Daten mit denen der Mutans-Streptokokken und Laktobazillen zu gewährleisten; deren höchste Säureproduktion in vitro lag bei pH 7,0.

Tompkins und Tagg (1986) untersuchten 62 Aktinomyzetenstämme – darunter *A. naeslundii* und *A. viscosus* – hinsichtlich ihrer Bakteriozinogenität, also der Produktion antibiotikaähnlicher Proteine. Die wirksame Substanz aus den Hemmhöfen, die sich bei den Indikatorstämmen *Micrococcus luteus* T-18, einer Streptokokke der Lancefield Gruppe A 71-698, *Streptococcus sanguis* ATCC 10557 und *Streptococcus mutans* NCTC 10449 ausgebildet hatten, wurde gaschromatographisch nicht als Protein sondern als eine Mischung aus Milch- und Bernsteinsäure in hohen Konzentrationen bestimmt. Die Autoren führten die inhibitorische Wirkung der Aktinomyzeten auf eine massive Säureproduktion zurück, zumal säuretolerante Indikatorstämme nicht gehemmt wurden. Sie schlußfolgerten weiterhin, daß Aktinomyzeten durch ihre zahlenmäßige Dominanz in der Plaque deutlich zur gesamten Säuremenge in der Plaquematrix beitragen. Damit begünstigen sie anfangs das Wachstum der säuretoleranteren Mutans-Streptokokken und Laktobazillen. Die vorliegenden Ergebnisse liegen dazu im Konsens. Da Aktinomyzeten besonders oft aus der Plaque exponierter kariöser Wurzeloberflächen isoliert wurden, wurde ihnen große Bedeutung bei der Auslösung und Progression der Wurzelkaries beigemessen, zumal das Zement aus weniger anorganischem Material besteht als der Schmelz. Für die koronale Kariesauslösung blieben die Mutans-Streptokokken als Verursacher unumstritten. Nach jüngeren Studien wird Mutans-Streptokokken auch eine Bedeutung für die Wurzelkariesauslösung zugesprochen (Keltjens et al., 1987; Bowden et al., 1990). Bowden (1991) vermutete, daß die Kariogenität der Aktinomyzeten in klinischen Studien zur Wurzelkaries möglicherweise durch die stärker azidogenen und azidurischen Mutans-Streptokokken und Laktobazillen

verschleiert wird. So konnten zuvor ja auch Firestone et al. (1987, 1989), Stöber et al. (1989a) und Kneist et al. (1990) im Wurzelkariesmodellexperiment an der Ratte nur mit Aktinomyzeten Wurzelkaries auslösen (Abb. 2).

Jordan und Hammond (1972) untersuchten kariöse Wurzelläsionen auf das Vorhandensein von filamentösen Bakterien, wobei gesunde Zahnflächen nicht kontrolliert wurden. Die Autoren fanden vorwiegend *A. naeslundii* vor, mit dem sie gnotobiotische Ratten infizierten. Die Ratten entwickelten schwere Parodontopathien und Wurzelkaries, so daß Jordan und Hammond (1972) in *A. naeslundii* auch den Verursacher der Wurzelkaries an den extrahierten menschlichen Zähnen sahen.

Schüpbach et al. (1995, 1996) kritisierten, daß in klinisch-mikrobiologischen Studien zur Ätiologie der Wurzelkaries gewöhnlich bei der Probenentnahme nicht zwischen oberflächlicher Plaque und dem darunterliegenden kariösen Dentin unterschieden wurde und es daher zu einer Vermischung der unterschiedlichen Populationen gekommen sein könnte. Um mögliche Fehlinterpretationen auszuschließen, entwickelten Schüpbach et al. (1995, 1996) neue Methoden zur Gewinnung der mikrobiellen Populationen aus den verschiedenen Stadien der Wurzelkaries, also von der Plaque bis hin zum Kavitätenboden bzw. der Pulpa. Allerdings konnten bei dem experimentellen Vorgehen nur extrahierte Zähne untersucht werden.

Schüpbach et al. (1996) konnten aufzeigen, daß der Anteil an Aktinomyzeten, besonders *A. naeslundii*, in initialen Läsionen der Wurzeloberflächen im Vergleich zu fortgeschrittenen Läsionen signifikant höher lag. In den fortgeschrittenen Läsionen verloren Aktinomyzeten gegenüber den stärker azidogenen und azidurischen Mutans-Streptokokken und Laktobazillen ihren selektiven Vorteil. Die Population der initialen Läsionen spiegelte die vorherrschende Flora der intakten Wurzeloberflächen wieder, während die mikrobielle Population in den fortgeschrittenen Läsionen bereits einem Selektionsprozeß unterworfen worden war.

Einzig Boyar und Bowden (1985) sahen die Aktinomyzeten auch als Verursacher der koronalen Karies an. *A. odontolyticus* wurde in progressiven approximalen kariösen Läsionen an Milchmolaren nachgewiesen (Boyar und Bowden, 1985). Nyvad und Kilian (1990) konnten experimentell mit *A. naeslundii* oder mit einer Mischkultur aus Streptokokken und Laktobazillen den höchsten Mineralverlust auf Wurzeloberflächen erzeugen. In Übereinstimmung zu Schüpbach et al. (1996) weisen die In-vitro-Befunde von Nyvad und Kilian (1990) auch auf eine Selektion der Wurzelkariesflora während

des Progressionsverlaufes hin. Eine Interpretation wäre auch dahingehend möglich, der „spezifischen Plaquehypothese“ sowohl für die Kariesinitiation als auch Kariesprogression Bedeutung einzuräumen, wobei es sich jeweils um unterschiedliche Populationen handeln dürfte, die verschiedenen Selektionsprozessen unterworfen waren. So beschrieben Hamilton und Svensäter (1998) bei azidurischen Bakterien einen Säureschock in subletalen pH-Bereichen, der eine Säuretoleranzreaktion auslöst, die die Keime bei extrem niedrigem pH-Wert (pH 3 bis 4) schützt. Ohne diesen subletalen Säureschock überlebten die gleichen Keime nicht. Die Säuretoleranzreaktion ging mit der Produktion säureregulierter Proteine einher, die die Bakterienzellen schützten. Die Schlüsselproteine können aber vermutlich nicht von allen Bakterien produziert werden. *A. naeslundii* konnte beispielsweise in den ersten 30 Minuten eines Säureschocks 9 Proteine bilden, überlebte aber nicht. Im Gegensatz zu *A. naeslundii* überlebten nach Säureschock *S. mutans* und Laktobazillen in extrem niedrigen pH-Bereichen. Für die Aufrechterhaltung der normalen zellulären pH-Homöostase wurden die H⁺/ATPasen in der Zellmembran verantwortlich gemacht sowie die Ausscheidung saurer Stoffwechselprodukte. Bender und Marquis (1987) untersuchten solche Membran-ATPasen und die Säuretoleranz von *L. casei* und *A. viscosus*. Die verschiedenen Säuretoleranzen der Keime begründeten die Autoren mit unterschiedlichen Mengen an Membran-ATPasen und deren biochemischen Eigenschaften. *A. viscosus* wies bei weniger Membran-ATPasen pro mg Membranprotein gleichzeitig ein höheres pH-Optimum der Aktivität dieser Proteine auf. Die vorliegenden Ergebnisse und die Befunde von Baake (2003) bestätigen eine Diskrepanz in der Säuretoleranz von Aktinomyzeten und Laktobazillen. Bei pH 5,0 lag bei den Laktobazillen noch eine 40 bis 42%ige Aktivität vor, während die der Aktinomyzeten bei 20% (*A. odontolyticus*) und 11% (*A. naeslundii*) lag (Tab. 28). Zusammenfassend läßt sich sagen, daß Aktinomyzeten mit ihren azidogenen und azidurischen Eigenschaften als frühe sowie zahlenmäßig dominierende Plaquebesiedler ebenfalls zur Absenkung des pH-Wertes in ihrer Umgebung beitragen und damit die Ansiedlung azidophiler Bakterien fördern. Für die Kariesprävention ist eine gute Mundhygiene daher unerlässlich.

7 **Schlußfolgerung**

Ziel vorliegender Studie war es, der maximalen Säureproduktion und Säuretoleranz der oralen Aktinomyzeten, *A. naeslundii* und *A. odontolyticus*, nachzugehen und die klinische Relevanz der Ergebnisse zu diskutieren.

Die Hochrechnung der Säuremengen bezogen auf das Vorkommen beider Keime in Plaque und Speichel im Vergleich zum Vorkommen von Mutans-Streptokokken und deren Säuremengen (Bergholz, 2002) ließ den Schluß zu, daß sowohl die unspezifische als auch spezifische Plaquehypothese für die Auslösung der Karies bedeutsam sind. Ohne Populationsverschiebungen zugunsten einer spezifischen azidogenen und azidurischen Mikroflora wäre Karies vermeidbar.

A. odontolyticus erwies sich als weniger azidogen jedoch als stärker azidurisch im Vergleich zu *A. naeslundii*. *A. naeslundii* dürfte als früher Besiedler der Plaque zunächst ein saures Milieu schaffen, in dem sich besonders kariogene Keime, vor allem Mutans-Streptokokken, etablieren können. In der Plaque der Studienteilnehmer waren die Aktinomyzeten mit etwa 60% in der Keimzahl vertreten. *A. odontolyticus*, Standortkeim des Speichels, dürfte in unversorgten Kavitäten auf Grund stärkerer azidurischer Eigenschaften besser überleben als *A. naeslundii* und zur Kariesprogression gleich den Laktobazillen beitragen.

Die unspezifische und spezifische Plaquehypothese bilden im Ergebnis der vorliegenden Untersuchung folglich eine Einheit.

Erstkolonisierer der Zahnflächen, wie die Aktinomyzeten, schaffen als unspezifische Keime die Basis für die nachfolgende Etablierung kariogener Keime. Letztere zeichnen sich durch deutlich höhere azidogene und azidurische Eigenschaften aus, die im Sinne der spezifischen Plaquehypothese die Integrität der Zahnhartsubstanzen zerstören. Primäre Kariesprävention gilt der Reduzierung der Erstbesiedler und damit der Etablierung der kariogenen Folgekeime. Sekundäre Kariesprävention ist erforderlich, um Nischen beider Keimgruppen durch Restauration von Kavitäten auszuräumen.

Deshalb erscheint nach wie vor die in der zahnärztlichen Praxis und über öffentliche Medien geführte Information und Motivation zur häuslichen Zahnpflege von Kindern und ihren Eltern als entscheidender Schlüssel für eine effektive Prophylaxe.

Das häusliche Putzen und demzufolge niedrige Keimzahlen sowie mäßiger Zuckerkonsum dürften sich als bester Schutz vor Karies erweisen.

8 Literaturverzeichnis

1. Asikainen S, Jousimies Somer H, Kanervo A and Summanen P (1987) Certain bacterial species and morphotypes in localized juvenile periodontitis and in matched controls. *J Periodontol* 58:224-230.
2. Baake K: Zur Säureproduktion und Säuretoleranz ausgewählter oraler Laktobazillen. Diss Med, Jena (2003)
3. Batty I (1958) *Actinomyces odontolyticus*, a new species of *Actinomyces* isolated from deep carious dentine. *J Pathol Bacteriol* 75:455-459.
4. Bender GR and Marquis RE (1987) Membrane ATPases and acid tolerance of *Actinomyces viscosus* and *Lactobacillus casei*. *Appl Environ Microbiol* 53:2124-2128.
5. Bennhoff DF (1984) Actinomycosis: diagnostic and therapeutic considerations and a review of 32 cases. *Laryngoscope* 94:1198-1217.
6. Bergey DH (1907) *Actinomyces* der Mundhöhle. *Zbl Bakt Parasitenkd Infekt, Abt I, Ref* 40:361.
7. Bergholz T: Säureproduktion und Säuretoleranz bei humanen Stämmen von *Streptococcus mutans*. Diss Med, Jena (2002).
8. Birkhed D (1978) Automatic titration method for determination of acid production from sugars and sugar alcohols in small samples of dental plaque material. *Caries Res* 12:128-136.
9. Black GV (1886) Gelatine forming microorganisms. *Indep Pract* 546-562.
10. Blech J: Leben auf dem Menschen. Die Geschichte unserer Besiedler. 2. Aufl. Rowohlt-Taschenbuch-Verlag, Hamburg (2000).
11. Bollinger O (1877) Über eine neue Pilzkrankheit beim Rinde. *Zbl Med Wiss* 15:481-485.
12. Boue D, Armau E and Tiraby G (1987) A bacteriological study of rampant caries in children. *J Dent Res* 60:23-28.
13. Bowden GH: Which bacteria are cariogenic in humans? In: Johnson NM (ed.): Dental caries, Vol. 1., Markers of high and low risk groups and individuals. Cambridge University Press, Cambridge (1991) S. 266-286.
14. Bowden GH, Ekstrand J, Mc Naughton B and Challacombe SJ (1990) The association of selected bacteria with lesions of root surface caries. *Oral Microbiol Immunol* 5:346-351.

15. Boyar RM and Bowden GH (1985) The microflora associated with the progression of incipient carious lesions in teeth of children living in a water-fluoridated area. *Caries Res* 19:298-306.
16. Boyd A and Williams RAD (1971) Estimation of the volumes of bacterial cells by scanning electron microscopy. *Arch Oral Biol* 16:259-267.
17. Breed RS and Conn HJ (1919) The nomenclature of the Actinomycetaceae. *J Bacteriol* 4:585-602.
18. Brown LR, Billings RJ and Kaster AG (1986) Quantitative comparisons of potentially cariogenic microorganisms cultured from noncarious and carious root and coronal tooth surface. *Infect Immun* 51:765-770.
19. Buchanan AM and Pine L (1962) Characterisation of a propionic acid-producing actinomycete, *Actinomyces propionicus*, sp. nov. *J Gen Microbiol* 28:305-323.
20. Buchanan AM and Pine L (1967) Path of glucose breakdown and cell yields of a facultative anaerobe, *Actinomyces naeslundii*. *J Gen Microbiol* 46:225-236.
21. Buchanan AM, Scott JL, Gerencser MA, Beaman BL, Jang S and Biberstein EL (1984) *Actinomyces hordeovulneris* sp. nov., an agent of canine actinomycosis. *Int J Syst Bacteriol* 34:439-443.
22. Bujwid O (1889) Über die Reinkultur des Actinomyces. *Zbl Bakt Hyg* 6:630-633.
23. Cato EP, Moore WEC, Nygaard G and Holdeman LV (1984) *Actinomyces meyeri* sp. nov., specific epithet rev. *Int J Syst Bacteriol* 34:487-489.
24. Clarke JK (1924) On the bacterial factor in the etiology of dental caries. *Br J Exp Pathol* 5:141-147.
25. Collins MD and Jones D (1982) Reclassification of *Corynebacterium pyogenes* (Glage) in the genus *Actinomyces* as *Actinomyces pyogenes* comb. nov. *J Gen Microbiology* 128:901-903.
26. Collins PA, Gerencser M and Slack JM (1973) Enumeration and identification of Actinomycetaceae in human dental calculus using the fluorescent antibody technique. *Arch Oral Biol* 18:145-153.
27. Collins MD, Hoyles L, Kalfas S, Sundquist G, Monsen T, Nikolaitchouk N and Falsen E (2000) Characterisation of *Actinomyces* isolates from infected root canals of teeth: description of *Actinomyces radidentis* sp. nov. *J Clin Microbiol* 38:3399-3403.
28. Dean HT (1933) Distribution of mottled enamel in the United States. *J Am Dent Assoc* 20:319-333.

29. Dean HT (1934) Classification of mottled enamel diagnosis. J Am Dent Assoc 21:1421-1426.
30. Dean HT (1936) Chronic endemic dental fluorosis (mottled enamel). J Am Med Assoc 107:1269-1273.
31. Dean HT (1938) Endemic fluorosis and its relation to dental caries. Publ Health Rep 53:1443-1452.
32. Dean HT and Elvolve E (1936) Some epidemiological aspects of chronic endemic dental fluorosis. Am J Publ Health 26:567-575.
33. Dean HT, Arnold FA and Elvolve E (1942) Domestic water and dental caries. Additional studies of the relation of fluoride domestic waters to dental caries experience in 4425 white children, aged 12 to 14 years, of 13 cities in 4 states. Publ Health Rep 56:761-792.
34. Dean HT, Jay P, Arnold FA and Elvolve E (1941) Domestic water and dental caries. II. A study of 2832 white children, aged 12 to 14 years, of 8 suburban Chicago communities, including *Lactobacillus acidophilus* studies of 1761 children. Publ Health Rep 57:1155-1179.
35. De Jong MH, van der Hoeven JS, van Os JH and Olijve JH (1984) Growth of oral *Streptococcus* species and *Actinomyces viscosus* in human saliva. Appl Environ Microbiol 47:901-904.
36. Dent VE and Williams RAD (1984a) *Actinomyces denticolens* Dent & Williams sp. nov.: A new species from the dental plaque of cattle. J Appl Bacteriol 56:183-192.
37. Dent VE and Williams RAD (1984b) *Actinomyces howellii*, a new species from the dental plaque of dairy cattle. Int J Syst Bacteriol 34:316-320.
38. Dent VE and Williams RAD (1984c) Deoxyribonucleic acid reassociation between *Actinomyces denticolens* and other *Actinomyces* species from dental plaque. Int J Syst Bacteriol 34:501-502.
39. Dent VE and Williams RAD (1986) *Actinomyces slackii* sp. nov. from dental plaque of dairy cattle. Int J Syst Bacteriol 36:392-395.
40. Distler W, Kagermeier-Callaway A and Kröncke A (1992) Products of carbohydrate metabolism of *Actinomyces viscosus* A 90 in continuous culture. Microbial Ecol Health Dis 5:117-120.
41. Ellen RP and Onose H (1978) pH measurements of *Actinomyces viscosus* colonies grown on media containing dietary carbohydrates. Arch Oral Biol 23:105-109.

42. Ellen RP, Banting DW and Fillery ED (1985) Longitudinal microbiological investigation of a hospitalized population of older adults with a high root surface caries risk. *J Dent Res* 64:1377-1381.
43. Firestone AR, Graves C and Feagin FF (1989) Caries on root surfaces exposed following gingivectomy in conventional rats infected with *Streptococcus sobrinus* (mutans) and *Actinomyces viscosus*. *J Periodontol* 60:624-627.
44. Firestone AR, Graves C, Caufield PW and Feagin FF (1987) Root surface caries subsequent to gingivectomy in rats inoculated with *Streptococcus sobrinus* (mutans) and *Actinomyces viscosus*. *J Dent Res* 66:1583-1586.
45. Fure S, Romaniec M, Emilson CG and Krasse B (1987) Proportions of *Streptococcus mutans*, lactobacilli and *Actinomyces* spp. in root surface plaque. *Scand J Dent Res* 95:119-123.
46. Funke G, Stubbs S, von Graevenitz A and Collins MD (1994) Assignment of human-derived CDC group 1 coryneform bacteria and CDC group 1-like coryneform bacteria to the genus *Actinomyces* as *Actinomyces neuui* subsp. *neuui* sp. nov., subsp. nov., and *Actinomyces neuui* subsp. *anitratus* subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 44:167-171.
47. Funke G, Alvarez N, Pascual C, Falsen E, Akervall E, Sabbe L, Schouls L, Weiss N and Collins MD (1997) *Actinomyces europaeus* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Bacteriol* 47:687-692.
48. Georg LK, Pine L and Gerencser MA (1969) *Actinomyces viscosus*, comb. nov., a catalase-positive facultative member of the genus *Actinomyces*. *Int J Syst Bacteriol* 19:291-293.
49. Gledhill WE and Casida LE, Jr (1969) Predominant catalase-negative soil bacteria. II. Occurrence and characterisation of *Actinomyces humiferus* sp. nov. *Appl Microbiol* 18:114-121.
50. Hamilton IR and Svensäter G (1998) Acid-regulated proteins induced by *Streptococcus mutans* and other oral bacteria during acid shock. *Oral Microbiol Immunol* 13:292-300.
51. Harper DS and Loesche WJ (1984) Growth and acid tolerance of human dental plaque bacteria. *Arch Oral Biol* 29:843-848.
52. Heinrich R und Kneist S Die Vitalerhaltung des Milchzahnendodonts – Eine klinisch-mikrobiologische Studie. Diss B, Erfurt (1987).
53. Heinrich R und Kneist S (1988) Mikrobiologisch-histologisch kontrollierte Therapiestudie zur Effektivitätsbewertung der einzeitigen und schrittweisen

- Caries-profunda-Therapie. Stomatol DDR 38:693-698.
54. Heinrich R, Kneist S und Künzel W (1991) Klinisch kontrollierte Untersuchung zur Caries-profunda-Therapie am Milchmolaren. Dtsch Zahnärztl Z 46:581-584.
 55. Hill PE, Knox KW, Schamschula RG and Tabua J (1977) The identification and enumeration of Actinomyces from plaque of New Guinea indigenes. Caries Res 11:327-335.
 56. Holm P (1950) Studies on the etiology of human actinomycosis. I. The "other microbes" of actinomycosis and their importance. Acta Pathol Microbiol Scand 27:736-751.
 57. Howell A Jr, Jordan HV, Georg LK and Pine I (1965) Odontomyces viscosus, gen. nov., spec. nov., a filamentous microorganism isolated from periodontal plaque in hamsters. Sabouraudia 4:65-68.
 58. Israel J (1878) Neue Beobachtungen auf dem Gebiete der Mykosen des Menschen. Arch Pathol Anat Physiol Klin Med 74:15-53.
 59. Johnson JL, Moore LV, Kaneko B and Moore WE (1990) Actinomyces gerencseriae sp. nov., designation of two genospecies of Actinomyces naeslundii, and inclusion of A. naeslundii serotypes II and III and Actinomyces viscosus serotype II in A. naeslundii genospecies 2. Int J Syst Bacteriol 40:273-286.
 60. Jordan HV and Hammond BF (1972) Filamentous bacteria isolated from rootsurface caries. Arch Oral Biol 17:1-12.
 61. Jordan HV and Sumney DL (1973) Root surface caries: Review of the literature and significance of the problem. J Periodontol 44:158-163.
 62. Kaetzke A, Körner H, Kneist S and Eschrich K (eingereicht, 2003) Unambiguous Macroscopic classification of oral Actinomyces isolates forming red colonies on brain heart blood agar to the species A. odontolyticus. J Clin Microbiol.
 63. Kalfas S (2002) persönliche Mitteilung während des 7th European Oral Microbiology Workshop, 3rd – 5th May 2002, Jena, Germany.
 64. Kalfas S, Maki Y, Birkhed D and Edwardsson S (1990) Effect of pH on acid production from sorbitol in washed cell suspensions of oral bacteria. Caries Res 24:107-112.
 65. Kalfas S, Figdor D and Sundqvist G (2001) A new bacterial species associated with failed endodontic treatment: identification and description of Actinomyces radicentis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 92:208-214.
 66. Keltjens HM, Schaeken MJ, van der Hoeven JS and Hendriks JC (1987) Microflora of plaque from sound and carious root surfaces. Caries Res 21:193-

- 199.
67. Keyes PH (1962) Recent advances in dental caries research. Bacteriology, bacteriological findings, and biological implications. *Int Dent J* 12:443-464.
 68. Kneist S, Heinrich R und Künzel W (1989) Mikrobielle Besiedlung kariöser Progressionsstadien im Dentin menschlicher Zähne – eine kontrollierte Therapiestudie. *Zbl Bakt Hyg* 26:385-395.
 69. Kneist S, Stößer L und Großer W (1990) Root caries in rats subsequent to gingivectomy and inoculation with *Streptococcus sobrinus* OMZ 176 and *Actinomyces viscosus* OMZ 105. *Caries Res* 23:409.
 70. Kneist S, Heinrich-Weltzien R, Tietze W, Schumann V und Stößer L: Die mikrobielle Mundhöhlenbesiedlung als Grundvoraussetzung des Kariesrisikos – Eine Übersicht der Befunde aus der Erfurter Studie. In: Stößer L (Hrsg): *Kariesdynamik und Kariesrisiko*. Quintessenz Verlag, Berlin (1998) S. 201-213.
 71. Kneist S, Bergholz T, Fischer T and Stößer L (1999) Acid production by human strains of Mutans-Streptococci. *Caries Res* 33:290.
 72. Komiyama K and Khandelwal RL (1992) Acid production by *Actinomyces viscosus* of root surface caries and non-caries origin during glycogen synthesis and degradation at different pH levels. *J Oral Pathol Med* 21:343-347.
 73. Komiyama K, Khandelwal RL and Heinrich SE (1988) Glycogen synthetic and degradative activities by *Actinomyces viscosus* and *Actinomyces naeslundii* of root surface caries and noncaries sites. *Caries Res* 22:217-25.
 74. König KG: *Karies und Kariesprophylaxe*. Goldmann, München (1971).
 75. Künzel W: *Caries decline in Deutschland. Eine Studie zur Entwicklung der Mundgesundheit*. Hüthig, Heidelberg (1997).
 76. Lachner-Sandoval V: *Über Strahlenpilze. Eine bakteriologisch-botanische Untersuchung*. Inaugural-Dissertation Straßburg. Universitäts-Buchdruckerei von Carl-Georgi, Bonn (1898).
 77. Lawson P, Nikolaitchouk N, Falsen E, Westling K and Collins MD (1997) Characterisation of some *Actinomyces*-like isolates from human clinical specimens: reclassification of *Actinomyces suis* (Soltys and Spratling) as *Actinomyces suis* comb. nov. and description of *Actinobaculum schalii* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 47:899-903
 78. Lawson P, Falsen E, Akervall E, Vandamme P and Collins MD (2001) *Actinomyces funkei* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:853-855.

79. Lentze FA (1938a) Zur Bakteriologie und Vakzinetherapie der Aktinomykose. Zbl Bakteriolog Parasitenkd Infektionskrankh Hyg, I. Abt, Orig 141:21-36.
80. Lentze FA (1938b) Die mikrobiologische Diagnostik der Aktinomykose. Münch Med Wochenschr 47:1826-1836.
81. Lentze FA: Die Aktinomykose und die Nocardiosen. In: Grumbach A und Bonin O (Hrsg.): Die Infektionskrankheiten des Menschen und ihre Erreger, Vol. I, 2nd ed. Thieme Verlag, Stuttgart (1969) S. 954-973.
82. Lentze FA: Klinik, Diagnostik und Therapie der Aktinomykosen. In: Diagnostik und Therapie der Pilzkrankheiten und neuere Erkenntnisse in der Biochemie der pathogenen Pilze (Kongressreferate, 6. Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft am 15. Juli 1966) Grosse Verlag, Berlin (1970) S. 83-92.
83. Loesche WJ (1986) Role of Streptococcus mutans in human dental decay. Microbiol Rev 50:353-380.
84. Loesche WJ and Syed SA (1978) Bacteriology of human experimental gingivitis: effect of plaque and gingivitis score. Infect Immun 21:830-839.
85. Loesche WJ, Hochett RN and Syed SA (1972) The predominant cultivated flora of tooth surface plaque removed from institutionalized subjects. Arch Oral Biol 17:1311-1325.
86. Loesche WJ, Syed SA, Schmidt F and Morrison EC (1985) Bacterial profiles of subgingival plaque in periodontitis. J Periodontol 56:447-456.
87. Lord FT (1919) The etiology of actinomycosis. J Am Med Assoc 55:1261-1263.
88. Marsh P und Martin M: Oral Microbiology. Chapman & Hall, London (1992).
89. Meyer K (1911) Über eine anaerobe Streptothrix-Art. Zbl Bakt Hyg, 1. Abt, Orig 60:75-78.
90. Miller DW: Die Mikroorganismen der Mundhöhle. Thieme, Leipzig (1889).
91. Moore WE, Holdeman LV, Smibert RM, Good IJ, Burmeister JA, Palcanis KG and Ranney RR (1982) Bacteriology of experimental gingivitis in young adult humans. Infect Immun 38:651-667.
92. Moore WE, Holdeman LV, Smibert RM, Cato EP, Burmeister JA, Palcanis KG and Ranney RR (1984) Bacteriology of experimental gingivitis in children. Infect Immun 46:1-6.
93. Nikolaitchouk N, Hoyles L, Falsen E, Grainger JM and Collins MD (2000) Characterisation of Actinomyces isolates from samples from the human urogenital tract: description of Actinomyces urogenitales sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol

- 50:1649-1654.
94. Nyvad B and Fejerskov O (1989) Structure of dental plaque and the plaque-enamel interface in human experimental caries. *Caries Res* 23:151-158.
 95. Nyvad B and Kilian M (1990) Microflora associated with experimental root surface caries in humans. *Infect Immun* 58:1628-1633.
 96. Olson TS, Seid AB and Pransky SM (1989) Actinomycosis of the middle ear. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 17:51-55.
 97. Orland FJ, Blayney JR, Harrison RW, Reyniers JA, Trexler PC, Wagner M, Gordon HA and Luckey TD (1954) Use of the germ free animal technic in the study of experimental dental caries. Basic observation on rats reared free of all microorganisms. *J Dent Res* 33:147-174.
 98. Orland FJ, Blayney JR, Harrison RW, Reyniers JA, Trexler PC, Ervin RF, Gordon HA and Wagner M, (1955) Experimental caries in germ free rats inoculated with enterococci. *J Am Dent Assoc* 50:259-273.
 99. Pape HD, Schaal KP und Braun J (1984) Erreger- und Resistenzspektrum bei odontogenen Infektionen. In: Pfeifer G und Schwenzer N (Hrsg.): Fortschritte der Kiefer- und Gesichts-Chirurgie Band 19. Septische Mund-Kiefer-Gesichts-Chirurgie, Thieme, Stuttgart, New York (1984) S. 86-88.
 100. Pine L and Hardin H (1959) *A. israelii*, a cause of lacrimal canaliculitis in man. *J Bacteriol* 78:164-170.
 101. Pine L and Georg LK (1969a) Reclassification of *Actinomyces propionicus*. *Int J Syst Bacteriol* 19:267-272.
 102. Pine L and Georg LK (1969b) The classification of *Actinomyces propionicus*. *Int Bull Bacteriol Nomenclature Taxonomy* 15:143-163.
 103. Pine L, Howell A and Watson SJ (1960) Studies of the morphological, physiological and biochemical characters of *Actinomyces bovis*. *J Gen Microbiol* 23:403-424.
 104. Prévot AR (1938) Etude de systematique bacterienne. III. Invalidité du genre *Bacteroides* Castelani et Chalmers, demembrement et reclassification. *Annal Inst Pasteur* 60:285-307.
 105. Pulverer G (1974) Problems of human actinomycosis. *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczonej* 28:253-260.
 106. Pulverer G and Schaal KP: Pathogenicity and medical importance of aerobic and anaerobic actinomycetes. In: Mordarsky M, Kurylowicz W and Jeljaszewicz J (eds.): *Nocardia and Streptomyces*, Fischer Verlag, Stuttgart (1978) S. 417-427.

107. Pulverer G and Schaal KP (1984a) Human actinomycoses. *Drugs Exp Clin Res* X (3):187-196.
108. Pulverer G and Schaal KP: Medical and microbiological problems in human actinomycoses. In: Ortiz-Ortiz L, Bojalil LF and Yakoleff V (eds.): *Biological, biochemical, and biomedical aspects of actinomycetes*, Academic Press, Orlando (1984b) S. 161-170.
109. Ramos P, Falsen E, Alvarez N, Akervaii E, Sjöden B and Collins MD (1997) *Actinomyces graevenitzii* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *J Clin Microbiol* 35:2011-2014.
110. Reddy CA, Cornell CP and Fraga AM (1982) Transfer of *Corynebacterium pyogenes* (Glage) Eberson to the genus *Actinomyces* as *Actinomyces pyogenes* (Glage) comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 32:419-429.
111. Sarkonen N, Könönen E, Summanen P, Könönen M and Jousimies-Somer H (2001) Phenotypic identification of *Actinomyces* and related species isolated from human sources. *J Clin Microbiol* 39:3955-3961.
112. Schaal KP (1979) Die Aktinomykosen des Menschen – Diagnose und Therapie. *Dtsch Ärztebl* 31:1997-2006.
113. Schaal KP (1981) Actinomycoses. *Rev Inst Pasteur (Lyon)* 14:279-288.
114. Schaal KP: Laboratory diagnosis of actinomycete diseases. In: Goodfellow M, Mordarski M and Williams ST (eds.): *The biology of the actinomycetes*, Academic Press, London (1984) S. 425-456.
115. Schaal KP (1985) Die Aktinomykosen des Menschen. *Intern Welt* 8:32-38.
116. Schaal KP: Genus *Actinomyces* Harz 1877. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME and Holt JG (eds.): *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2, Williams and Wilkins, Baltimore (1986) S. 1383-1418.
117. Schaal KP: Die Aktinomyzeten. In: Brandis H and Pulverer G (Hrsg.): *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie*, 6th ed., Fischer Verlag, Stuttgart, New York (1988a) S. 472-488.
118. Schaal KP: Actinomycetes as human pathogens. In: Okami Y, Beppu T and Ogawara H (eds.): *Biology of Actinomycetes*, 88. Proceedings of 7th International Symposium on Biology of Actinomycetes, Japan Scientific Societies Press, Tokyo (1988b) S. 277-282.
119. Schaal KP and Beaman BL: Clinical significance of actinomycetes. In: Goodfellow M, Mordarski M and Williams ST (eds.): *The biology of the actinomycetes*, Academic Press, London (1984) S. 389-424.

120. Schaal KP and Pulverer G: Epidemiologic, etiologic, diagnostic, and therapeutic aspects of endogenous actinomycete infections. In: Ortiz-Ortiz L, Bojalil LF and Yakoleff V (eds.): Biological, biochemical, and biomedical aspects of actinomycetes, Academic Press, Orlando (1984) S. 13-32.
121. Scharf S: Zur Bacteriocinproduktion von Mutans-Streptokokken. Diss Med, Jena (2003)
122. Schofield GM and Schaal KP (1981) A numerical taxonomic study of members of the Actinomycetaceae and related taxa. J Gen Microbiol 127:237-259.
123. Schüpbach P, Osterwalder V and Guggenheim B (1995) Human root caries: microbiota in plaque covering sound, carious and arrested carious root surfaces. Caries Res 29:382-395.
124. Schüpbach P, Osterwalder V and Guggenheim B (1996) Human root caries: microbiota of a limited number of root caries lesions. Caries Res 30:52-64.
125. Seichter U (1987) Root surface caries: a critical literature review. JADA, Vol. 115:305-310.
126. Shakespeare AP, Drucker DB and Green RM (1985) The comparative cariogenicity and plaque-forming ability in vivo of four species of the bacterium Actinomyces in gnotobiotic rats. Arch Oral Biol 30:855-858.
127. Slack JM and Gerencser MA: Filamentous Bacteria: Biology and Pathogenicity. Burgess, Minneapolis (1975)
128. Slack JM, Landfried S and Gerencser MA (1971) Identification of Actinomyces and related bacteria in dental calculus by fluorescent antibody technique. J Dent Res 50:78-82.
129. Smego RA, Jr. (1987) Actinomycosis of the central nervous system. Rev Infect Dis 9:855-865.
130. Socransky SS (1970) Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. J Dent Res 49:203-222.
131. Socransky SS and Manganiello SD (1971) The oral microbiota of man from birth to senility. J Periodontol 42:485-496.
132. Stackebrandt E and Charfreitag O (1990) Partial 16S-rRNA primary structure of five Actinomyces species: phylogenetic implications and development of an Actinomyces israelii-specific oligonucleotide probe. J Gen Microbiol in press
133. Stephan RM (1944) Intra-oral hydrogen-ion concentration associated with dental caries activity. J Dent Res 23:257-266.
134. Stößer L, Kneist S, Großer W und Künzel W (1989a) Root caries – a rat model.

- Zahn Mund Kieferheilkd Zbl 77:655-658.
135. Stöber L, Rohland F and Seyfarth W (1989b) The spectrum of *S. mutans* OMZ 176 products from different mono- and disaccharides. Zahn Mund Kieferheilkd Zbl 77:815-818.
 136. Stöber L (Hrsg.): Kariesdynamik und Kariesrisiko. Quintessenz Verlag, Berlin (1998)
 137. Stöber L, Kneist S, Heinrich-Weltzien R, Fischer T and Tietze W: Current Research on Caries Risk Assessment. In: Stookey GK (ed.): Early Detection of Dental Caries II: Proceedings of the 4th Annual Indiana Conference Indianapolis, Indiana University School of Dentistry, India, Indianapolis, IN (2000) S. 31 – 56.
 138. Syed SA, Loesche WJ, Pape HL, Jr. and Grenier (1975) Predominant cultivable flora isolated from human root surface caries plaque. Infect Immun 11:727-731.
 139. Takahashi N and Yamada T (1999) Effects of pH on the glucose and lactate metabolism by the washed cells of *Actinomyces naeslundii* under anaerobic and aerobic conditions. Oral Microbiol Immunol 14:60-65.
 140. Thompson L and Lovestedt SA (1951) An *Actinomyces*-like organism obtained from the human mouth. Proc Staff Meetings Mayo Clinic 26:169-175.
 141. Tompkins GR and Tagg JR (1986) Incidence and characterization of antimicrobial effects produced by *Actinomyces viscosus* and *Actinomyces naeslundii*. J Dent Res 65:109-112.
 142. Winford TE and Haberman S (1966) Isolation of aerobic Gram-positive filamentous rods from diseased gingivae. J Dent Res 45:1159-1167.
 143. Winslow CEA, Broadhurst J, Buchanan RE, Krumwiede C, Rogers LA and Smith GH (1929) The families and genera of bacteria. J Bacteriol 5:191-229.
 144. Wolff M und Israel J (1891) Über Reincultur des *Actinomyces* und seine Übertragbarkeit auf Thiere. Arch Pathol Anat Physiol Klin Med 126:11-59.
 145. Wüst J, Stubbs S, Weiss N, Funke G and Collins MD (1995) Assignment of *Actinomyces pyogenes*-like (CDC coyneform group E) bacteria to the genus *Actinomyces* as *Actinomyces radingae* sp. nov. and *Actinomyces turicensis* sp. nov. Lett Appl Microbiol 20:76-81.
 146. Zero DT, van Houte J and Russo J (1986) Enamel demineralization by acid produced from endogenous substrate in oral streptococci. Arch Oral Biol 31:229-234.

9 Anhang

Tabelle 1: Wachstumskinetische Parameter von Aktinomyzeten während der logarithmischen Wachstumsphase

Stamm-Nr.	Kulturalter (Stunden) $\bar{x} \pm SD$	Verdünnung (10 ^x)	pH-Wert $\bar{x} \pm SD$	Extinktion (650 nm) $\bar{x} \pm SD$
<i>A. odontolyticus</i> creme				
R4/59	14	-1	6,21 0,20	0,129 0,029
R6/88	16,5	-2	6,25 0,04	0,139 0,026
W55/1007	16	-2	6,42 0,01	0,061 0,004
<i>A. odontolyticus</i> rot				
R22/580	17	-3	6,46 0,16	0,074 0,018
R48/1355	15	-2	6,33 0,00	0,143 0,002
W8/112	17	-2	6,32 0,12	0,149 0,007
W17/216	17	-2	6,23 0,11	0,145 0,013
W26/386	16	-2	6,24 0,02	0,136 0,025
<i>A. naeslundii</i>				
R3/35	14	-1	6,44 0,01	0,056 0,010
R29/794	16	-1	6,45 0,09	0,088 0,027
R24/661	16	-1	6,27 0,06	0,075 0,010
R38/1034	18	-1	6,22 0,02	0,061 0,008
W54/981	16	-0	6,00 0,06	0,112 0,006

Tabelle 2: Wachstumskinetische Parameter von Aktinomyzeten am Ende der logarithmischen Wachstumsphase

Stamm-Nr.	Kulturalter (Stunden)	Verdünnung (10 ^x)	pH-Wert	Extinktion (650 nm)
	$\bar{x} \pm SD$		$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$
<i>A. odontolyticus</i> creme				
R4/59	16	-1	6,10 0,18	0,277 0,076
R6/88	18,5	-2	6,03 0,12	0,225 0,023
W55/1007	18	-2	5,96 0,32	0,235 0,091
<i>A. odontolyticus</i> rot				
R22/580	20	-3	6,46 0,07	0,215 0,049
R48/1355	17	-2	5,83 0,08	0,370 0,014
W8/112	19	-2	5,93 0,01	0,246 0,008
W17/216	19	-2	5,98 0,08	0,267 0,002
W26/386	18	-2	5,99 0,09	0,263 0,006
<i>A. naeslundii</i>				
R3/35	16	-1	6,33 0,13	0,139 0,038
R29/794	18	-1	6,30 0,06	0,169 0,061
R24/661	18	-1	6,09 0,08	0,209 0,029
R38/1034	20	-1	5,81 0,13	0,175 0,017
W54/981	18	-0	5,70 0,18	0,202 0,032

Tabelle 3: Wachstumskinetische Parameter von Aktinomyzeten in der frühen stationären Wachstumsphase

Stamm-Nr.	Kulturalter (Stunden) $\bar{x} \pm SD$	Verdünnung (10 ^x)	pH-Wert $\bar{x} \pm SD$	Extinktion (650 nm) $\bar{x} \pm SD$
<i>A. odontolyticus creme</i>				
R4/59	18	-1	5,65 0,08	0,431 0,036
R6/88	20,5	-2	5,84 0,16	0,340 0,021
W55/1007	20	-2	5,13 0,14	0,549 0,044
<i>A. odontolyticus rot</i>				
R22/580	23	-3	5,37 0,26	0,515 0,103
R48/1355	19	-2	5,46 0,02	0,549 0,013
W8/112	21	-2	5,81 0,12	0,361 0,009
W17/216	21	-2	5,45 0,08	0,427 0,034
W26/386	20	-2	5,59 0,14	0,449 0,036
<i>A. naeslundii</i>				
R3/35	18	-1	6,11 0,05	0,285 0,109
R29/794	20	-1	5,43 0,28	0,512 0,123
R24/661	20	-1	5,80 0,11	0,328 0,028
R38/1034	22	-1	5,51 0,15	0,279 0,039
W54/981	20	-0	5,12 0,04	0,360 0,016

Tabelle 4: Vergleich der Säureproduktionen von Mutans-Streptokokken in der Plaque bei Kindern und Jugendlichen der Erfurter Kariesrisikostudie mit unterschiedlichem Kariesbefall zur Basisuntersuchung nach Multiplikation ihrer Säuremenge pro mg Bakterientrockengewicht (TG) mit ihrer Prävalenz

Mutans- Streptokokken	Prävalenz (%) in der Plaque	Säureproduktion x Prävalenz (nmol [H ⁺] min ⁻¹ mg ⁻¹ TG)			
		pH 8,0	pH 7,0	pH 6,0	pH 5,5 pH 5,0
Alle Kinder (n = 60)	4,0	n.d.	1100	652	412 224
Kariesfreie Kinder* (alle Kinder n = 16) (positive Kinder n = 3)	1,4 7,2	n.d. n.d.	406 2088	270 1390	175 98 900 504
Kinder mit mittlerem Kariesbefall** (alle Kinder n = 23) (positive Kinder n = 6)	2,7 10,5	n.d. n.d.	734 2856	359 1397	205 111 798 431
Kinder mit hohem Kariesbefall*** (alle Kinder n = 21) (positive Kinder n = 7)	7,5 22,4	n.d. n.d.	1965 5869	1215 3629	810 435 2419 1288

* Jg. 1980/81 dmft/DMFT = 0, Jg. 1984/85 dmft/DMFT = 0; **Jg. 1980/81 DMFT < 5, Jg. 1984/85 DMFT < 3; ***Jg. 1980/81 DMFT ≥ 5, Jg. 1984/85 DMFT ≥ 3
n.d. = nicht durchgeführt

Tabelle 5: Vergleich der Säureproduktionen von Aktinomyzeten in der Plaque bei Kindern und Jugendlichen der Erfurter Kariesrisikostudie mit unterschiedlichem Kariesbefall zur Basisuntersuchung nach Multiplikation ihrer Säuremenge pro mg Bakterientrockengewicht (TG) mit ihrer Prävalenz

Aktinomyzeten	Prävalenz (%) in der Plaque	Säureproduktion x Prävalenz (nmol [H ⁺] min ⁻¹ mg ⁻¹ TG)				
		pH 8,0	pH 7,0	pH 6,0	pH 5,5	pH 5,0
Alle Kinder (n = 60)						
<i>A. odontolyticus</i>	1,4	66	91	52	n.d.	18
<i>A. naestlundii</i>	36,2	2136	2679	1231	n.d.	290
<i>A. odontolyticus</i>						
Kariesfreie Kinder*						
(alle Kinder n = 16)	1,7	80	111	63	n.d.	22
(positive Kinder n = 5)	5,4	254	351	200	n.d.	70
Kinder mit mittlerem Kariesbefall**						
(alle Kinder n = 23)	1,3	61	85	48	n.d.	17
(positive Kinder n = 5)	6,1	287	397	226	n.d.	79
Kinder mit hohem Kariesbefall***						
(alle Kinder n = 21)	1,1	52	72	41	n.d.	14
(positive Kinder n = 7)	3,4	160	221	126	n.d.	44
<i>A. naestlundii</i>						
Kariesfreie Kinder*						
(alle Kinder n = 16)	48,2	2844	3567	1639	n.d.	386
(positive Kinder n = 14)	55,1	3251	4077	1873	n.d.	441
Kinder mit mittlerem Kariesbefall**						
(alle Kinder n = 23)	24,4	1440	1806	830	n.d.	195
(positive Kinder n = 21)	26,7	1575	1976	908	n.d.	214
Kinder mit hohem Kariesbefall****						
(alle Kinder n = 21)	39,9	2354	2953	1357	n.d.	319
(positive Kinder n = 21)	39,9	2354	2953	1357	n.d.	319

* Jg. 1980/81 dmft/DMFT = 0, Jg. 1984/85 dmft/DMFT = 0; **Jg. 1980/81 DMFT < 5, Jg. 1984/85 DMFT < 3; ***Jg. 1980/81 DMFT ≥ 5, Jg. 1984/85 DMFT ≥ 3

Tabelle 6: Vergleich der Säureproduktionen von Mutans-Streptokokken im Speichel bei Kindern und Jugendlichen der Erfurter Kariesrisikostudie mit unterschiedlichem Kariesbefall zur Basisuntersuchung nach Multiplikation ihrer Säuremenge pro mg Bakterientrockengewicht (TG) mit ihrer Prävalenz

Mutans- Streptokokken	Prävalenz (%) im Speichel	Säureproduktion x Prävalenz (nmol [H ⁺] min ⁻¹ mg ⁻¹ TG)			
		pH 8,0	pH 7,0	pH 6,0	pH 5,5 pH 5,0
Alle Kinder (n = 60)	2,6	n.d.	715	424	268 46
Kariesfreie Kinder* (alle Kinder n = 16) (positive Kinder n = 0)	0 0	n.d. n.d.	- -	- -	- -
Kinder mit mittlerem Kariesbefall** (alle Kinder n = 23) (positive Kinder n = 4)	1,7 9,7	n.d. n.d.	462 2638	226 1290	129 70 737 398
Kinder mit hohem Kariesbefall*** (alle Kinder n = 21) (positive Kinder n = 5)	5,6 23,7	n.d. n.d.	1467 6209	907 3839	605 325 2560 1375

* Jg. 1980/81 dmft/DMFT = 0, Jg. 1984/85 dmft/DMFT = 0; **Jg. 1980/81 DMFT < 5, Jg. 1984/85 DMFT < 3; ***Jg. 1980/81 DMFT ≥ 5, Jg. 1984/85 DMFT ≥ 3
n.d. = nicht durchgeführt

Tabelle 7: Vergleich der Säureproduktionen von Aktinomyzeten im Speichel bei Kindern und Jugendlichen der Erfurter Kariesrisikostudie mit unterschiedlichem Kariesbefall zur Basisuntersuchung nach Multiplikation ihrer Säuremenge pro mg Bakterientrockengewicht (TG) mit ihrer Prävalenz

Aktinomyzeten	Prävalenz (%) im Speichel	Säureproduktion x Prävalenz (nmol [H ⁺] min ⁻¹ mg ⁻¹ TG)				
		pH 8,0	pH 7,0	pH 6,0	pH 5,5	pH 5,0
Alle Kinder (n = 60)						
<i>A. odontolyticus</i>	5,6	263	364	207	n.d.	73
<i>A. naestlundii</i>	7,7	454	570	262	n.d.	62
<i>A. odontolyticus</i>						
Kariesfreie Kinder*						
(alle Kinder n = 16)	5,2	244	338	192	n.d.	68
(positive Kinder n = 5)	16,6	780	1079	614	n.d.	216
Kinder mit mittlerem Kariesbefall**						
(alle Kinder n = 23)	8,6	404	559	318	n.d.	112
(positive Kinder n = 13)	15,2	714	988	562	n.d.	198
Kinder mit hohem Kariesbefall***						
(alle Kinder n = 21)	2,7	127	176	100	n.d.	35
(positive Kinder n = 9)	6,7	324	449	255	n.d.	235
<i>A. naestlundii</i>						
Kariesfreie Kinder*						
(alle Kinder n = 16)	10,5	620	777	357	n.d.	84
(positive Kinder n = 10)	16,8	991	1243	571	n.d.	134
Kinder mit mittlerem Kariesbefall**						
(alle Kinder n = 23)	6,5	384	481	221	n.d.	52
(positive Kinder n = 13)	11,4	673	844	388	n.d.	91
Kinder mit hohem Kariesbefall***						
(alle Kinder n = 21)	7,0	413	518	238	n.d.	56
(positive Kinder n = 15)	9,8	578	725	333	n.d.	78

* Jg. 1980/81 dmft/DMFT = 0, Jg. 1984/85 dmft/DMFT = 0; **Jg. 1980/81 DMFT < 5, Jg. 1984/85 DMFT < 5, Jg. 1980/81 DMFT ≥ 5, Jg. 1984/85 DMFT ≥ 5

n.d. = nicht durchgeführt

* Jg. 1980/81 dmft/DMFT = 0, Jg. 1984/85 dmft/DMFT = 0; **Jg. 1980/81 DMFT < 5, Jg. 1984/85 DMFT < 3; ***Jg. 1980/81 DMFT ≥ 5, Jg. 1984/85 DMFT ≥ 3

n.d. = nicht durchgeführt

Benutzte Rezepturen und Kulturmedien**1. Standardnährbouillon (DNB)**

10,0 g Glucose	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
15,6 g Proteosepepton Nr. 3	Difco, Detroit, USA
2,8 g Hefeextrakt	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
5,6 g NaCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
ad 1000 ml Aqua dest.	
15 min. bei 121°C autoklavieren	
pH 7,2	

2. Agar nach BALMELLI

10,0 g Bacto-Tryptose	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
5,0 g Hefeextrakt	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
5,0 g K ₂ HPO ₄	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
3,0 g Fleischextrakt	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
50,0 g Saccharose	J. T. Baker, Deventer, Holland
25,0 g Agar	Difco, Detroit, USA
ad 1000 ml Aqua dest.	
15 min. bei 121°C autoklavieren	
pH 7,2	

3. Bouillon nach BALMELLI

10,0 g Bacto-Tryptose	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
5,0 g Hefeextrakt	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
5,0 g K ₂ HPO ₄	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
3,0 g Fleischextrakt	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
50,0 g Saccharose	J. T. Baker, Deventer, Holland
ad 1000 ml Aqua dest.	
15 min. bei 121°C autoklavieren	
pH 7,2	

4. NaCl/TEA-Puffer (0,002 M)

0,3714 g Triethanolaminhydrochlorid	Sigma, St. Louis, USA
ad 1000 ml 0,9% NaCl-Lösung	
pH 7,0	

5. Trypticase-Soja-Bouillon

30 g Fertigmedium	Becton Dickinson and Company, USA
ad 1000 ml Aqua dest.	
pH 7,3	

5. Natronlauge (0,005 N)

50 ml NaOH (0,1 mol/l)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
ad 1000 ml Aqua dest.	
pH 11,0 - 11,5	

6. Glucose-Lösung (0,5 M)

0,4504 g Glucose	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
ad 5 ml NaCl/TEA-Puffer	

Danksagung

Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. habil. Susanne Kneist danke ich für die Vergabe des Themas sowie ihre anregenden wissenschaftlichen Diskussionen, die wesentlich zur Entstehung der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Dr. Lutz Stöber, Direktor der Poliklinik für Präventive Zahnheilkunde des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Friedrich-Schiller-Universität Jena, danke ich für die Arbeitsmöglichkeit in der Poliklinik und für die wissenschaftliche Diskussion sowie sein Interesse am Gelingen der Arbeit.

Frau Ilona Albert und Frau Katrin von Brandenstein danke ich herzlich für die hilfsbereite Einarbeitung in die experimentellen Arbeitstechniken und für die Begleitung während der Durchführung der biochemischen Laboruntersuchungen.

Der Kommission zur Vergabe des Landesgraduiertenstipendiums an der Friedrich-Schiller-Universität Jena – unter Vorsitz von Herrn Prof. Dr. Mäusbacher – danke ich für die Gewährung des Landesgraduiertenstipendiums.

Lebenslauf**Persönliche Daten**

Name	Bauer, Heidi Karin
Geburtsdatum	02.10.1976, Erfurt
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	Bundesrepublik Deutschland

Schulbildung

09.1983 – 08.1991	Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule Tännichtschule Meerane
09.1991 – 07.1995	Pestalozzi-Gymnasium Meerane Abschluß: Hochschulreife

Studium

10.1995 – 03.2001	Studium der Zahnmedizin, Friedrich-Schiller-Universität Jena Abschluß: Staatsexamen, Approbation als Zahnärztin
04.2001 – 06.2003	Promotionsstudentin, Poliklinik für Präventive Zahnheilkunde, Friedrich-Schiller-Universität Jena

gefördert mit dem Graduiertenstipendium des Landes Thüringen

ausgezeichnet mit dem 1. Platz des Colgate / DGZMK Forschungspreises 2003

Berufstätigkeit

06.2003 – 10.2003	Vorbereitungsassistentin bei: ZÄ Angelika Lubahn Bahnhofstr. 1 36132 Eiterfeld
ab 12.2003	Zahnärztliche Praxisgemeinschaft Ralf Roth und Dr. Yvonne Bauer Heinrich-Heine-Str. 38 36433 Bad Salzungen

Jena, den 31.10.2003

Heidi Bauer

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskript unterstützt haben:

PD Dr. Susanne Kneist, Prof. Dr. Dr. L. Stößer

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und daß Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

daß ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

daß ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 31.10.2003

Heidi Bauer